



**Raquel Catarina
Saraiva Diaz**

**Prevalência e resistência de *Escherichia coli* em
ambulatório**



**Raquel Catarina
Saraiva Diaz**

**Prevalência e resistência de *Escherichia coli* em
ambulatório**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, professora auxiliar na Universidade de Aveiro do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Américo Freitas, Médico Especialista.

Dedico este trabalho aos meus pais, pela motivação e apoio que sempre me deram e à memória do meu avô Albano Mesquita, que muito se orgulharia da “menina dele”.

o júri

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira
Investigadora Pós-Doc., CESAM

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Dr. Américo Lopes de Freitas
Licenciado em Medicina. Director do Laboratório Médico de Análises Clínicas – Avelab.

agradecimentos

À Professora Doutora Sónia Mendo, orientadora, pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstrou.

Ao Doutor Américo Freitas, co-orientador, pela generosidade com que sempre partilhou os seus conhecimentos, pela atenção que nunca me negou, pela amizade e carinho.

À Sónia Ferreira, por todas as horas que me disponibilizou, pela paciência em me ouvir a ajudar.

À Gisela Silva e Elizabeth Costa, por todo o tempo de trabalho que perderam comigo, pelo apoio que nunca me negaram.

À minha família. Aos meus pais.

Aos meus amigos por sempre terem acreditado em mim. Ao Luís Farinha.

A todos que fizeram deste trabalho uma realidade...Obrigada!

palavras-chave

Escherichia coli, Sulfonamidas, Trimetoprim, integroons, resistência antimicrobiana, antibióticos.

resumo

A resistência aos antimicrobianos é um problema crescente no contexto clínico. É consequência de uma terapia inadequada e resulta das dificuldades crescentes no tratamento de infecções bacterianas. Actualmente é a grande ameaça no público saudável e tem aumentado significativamente em infecções adquiridas na comunidade, como por exemplo infecções urinárias. *E. coli* é o principal microrganismo responsável por infecções urinárias em ambulatório e apresenta uma percentagem significativa de resistências ao Sulfametoxazol + Trimetoprim (SxT). A eficácia antimicrobiana e o baixo custo fizeram com que se tornassem antibióticos de eleição para o tratamento de infecções urinárias. Contudo, por esse motivo, têm-se verificado um aumento da taxa de resistência a estes compostos.

O presente estudo foi efectuado, durante um período de 3 meses, em isolados de *E. coli* recolhidos de pacientes de ambulatório da região centro de Portugal, Aveiro, com suspeita de ITU. Tendo em conta o perfil de antibióticos testado verificou-se maior percentagem de resistência à amoxicilina, cefatrizina, norfloxacin e SxT. Este último grupo está fortemente relacionado com terapias empíricas, tendo por isso sido o seleccionado para o presente estudo. São conhecidos três genes, *sul1*, *sul2* e *sul3*, implicados na resistência às Sulfonamidas. De um total de 547 isolados de *E. coli* foram seleccionados 25 isolados resistentes ao SxT. Destes, 19 foram positivos na pesquisa do gene de integração de classe 1, 13 para a pesquisa de *sul1*, 16 para a pesquisa de *sul2* e 2 para a pesquisa de *sul3*. Variantes do gene *dhfr* foram predominantes nas zonas variáveis amplificadas.

Em conclusão, a percentagem de resistência ao SxT em estirpes de *E. coli* não é a mais elevada contudo a localização de genes de resistência em elementos genéticos móveis pode indicar uma forte disseminação da resistência e um aumento no fracasso dos tratamentos com este grupo de antibióticos.

keywords

Escherichia coli, Sulfonamides, Trimethoprim, integrons, antimicrobial resistance, antibiotics

abstract

Antimicrobial resistance is a major problem in the clinical context. It results from inadequate therapy and results in difficulties to treat bacterial infections. Nowadays, it represents a significant threat for the general healthy public as infections are increasing significantly among the community, with urinary infections as an example of that. *Escherichia coli* is the main microorganism responsible for urinary infections in the community and shows a significant percentage of resistance to Sulfamethoxazole + Trimethoprim (SxT). Due to its antimicrobial efficacy and low cost, SxT became the leading antibiotic for treatment of urinary tract infections. However, the resistance rates among the isolates have increased over the last decades. During a three month study performed at the community level, results showed that *Escherichia coli* is the most common microorganism isolated from patients with UTI. Antibiotic resistance profile revealed a high rate of resistance to Amoxicilin, Cefatrizin, Norfloxacin and SxT. This last group is strongly related to the empirical therapy, therefore isolates resistant to SxT were selected for further studies. Three genes are known to be involved in Sulfonamides resistance: *sul1*, *sul2* and *sul3*. From a total of 547 *E. coli* isolates collected from a health care unit from individuals from Aveiro, Central Portugal, with suspected ITU, 25 *E.coli* resistant to SxT were selected for this study. 19 of these were positive for the presence of the gene *int1*, indicating the presence of class 1 integron(s); 13 were positive for the presence of *sul1*, 16 were positive for *sul2* and 2 for the *sul3* gene. Variants of the *dhfr* were predominant in the amplified variable regions. Results showed that the main resistance mechanism to Sulfonamides seems to be related to the presence of class 1 integrons. To conclude, the percentage of resistance to SxT in the *E.coli* strains is not very high; the resistance genes are located in mobile genetic elements providing the mobilization of these genes and, therefore, contributing to the failure of the treatments with this group of antibiotics.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
I. Introdução	1
1.1. Enterobacteriaceae.....	2
1.1.1. Escherichia coli.....	2
1.1.1.1. Factores de Virulência	3
1.1.1.2. Epidemiologia.....	3
1.1.1.3. Manifestações Clínicas	4
1.1.1.4. Isolamento e Identificação.....	6
1.1.1.5. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	7
1.2. Antimicrobianos	8
1.2.1. Antibióticos β - lactâmicos	9
1.2.1.1. Classificação e estrutura química	10
1.2.1.2. Mecanismo de acção.....	11
1.2.1.3. Mecanismos de resistência	13
1.2.2. Quinolonas.....	13
1.2.2.1. Classificação e estrutura química	14
1.2.2.2. Mecanismo de acção.....	15
1.2.2.3. Mecanismos de resistência	15
1.2.3. Aminoglicosídeos	16
1.2.3.1. Classificação e estrutura química	17
1.2.3.2. Mecanismos de acção	17

1.2.3.3. Mecanismos de resistência	18
1.2.4. Sulfonamidas e Trimetoprim.....	18
1.2.4.1. Classificação e estrutura química.....	19
1.2.4.2. Mecanismo de acção	19
1.2.4.3. Mecanismo de resistência.....	20
1.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana	21
1.3.1. Transferência de genes entre bactérias.....	22
1.3.1.1. Transformação.....	23
1.3.1.2. Transdução	23
1.3.1.3. Conjugação.....	23
1.3.2. Elementos genéticos móveis	24
1.3.2.1. Plasmídeos.....	25
1.3.2.2. Sequências de Inserção.....	26
1.3.2.3. Transposões	27
1.3.2.4. Integrões	28
1.4. Genotipagem	30
II. Objectivos.....	33
III. Material e Métodos.....	35
3.1. Isolados bacterianos	35
3.2. Identificação dos isolados bacterianos	35
3.2.1. Coloração de Gram.....	35
3.2.1.1. Procedimento.....	36
3.2.2. Cultura em meio Levine	37
3.2.3. Identificação de <i>E. coli</i> pelo método Clássico	37
3.3. Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos.....	41
3.3.1. Procedimento.....	41

3.3.2. Perfil de antibióticos testados para <i>E. coli</i>	42
3.4. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	43
3.4.1. Pesquisa de integrões.....	43
3.4.2. Pesquisa dos genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> e <i>sul3</i>	44
3.5. Estudo da variabilidade genética	46
3.6. Purificação e Sequenciação de produtos de PCR	47
3.7. Electroforese em gel de agarose e visualização do DNA.....	48
IV. Resultados e Discussão.....	49
4.1. Dados epidemiológicos.....	49
4.1.1. Isolados bacterianos.....	54
4.1.2. Resistências aos antimicrobianos testados	57
4.1.2.1. Resistências de isolados de <i>E. coli</i> a antibióticos da classe das Penicilinas	57
4.1.2.2. Resistências de isolados de <i>E. coli</i> a antibióticos da classe das Cefalosporinas	58
4.1.2.3. Resistências de isolados de <i>E. coli</i> a antibióticos do grupo dos Monobactâmicos, Carbapenemos e Amoxicilina + Ácido Clavulânico.....	59
4.1.2.4. Resistências de isolados de <i>E. coli</i> a antibióticos do grupo dos Aminoglicosídeos	60
4.1.2.5. Resistências de isolados de <i>E. coli</i> a antibióticos do grupo das Quinolonas	61
4.1.2.6. Resistências de isolados de <i>E. coli</i> a antibióticos do grupo do Sulfametoxazol + Trimetoprim	62
4.1.2.7. Total de antibióticos com maior perfil de resistências em isolados de <i>E. coli</i>	63
4.2. Pesquisa de integrões.....	64
4.2.1. Pesquisa do gene da integrase de classe 1	65

4.2.2. Pesquisa de zonas variáveis.....	66
4.2.3. Pesquisa de genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> e <i>sul3</i>	68
4.2.3.1. Pesquisa do gene <i>sul1</i>	68
4.2.3.2. Pesquisa do gene <i>sul2</i>	69
4.2.3.3. Pesquisa do gene <i>sul3</i>	69
4.2.4. Isolados de <i>E. coli</i> negativos para a presença de sequências específicas dos genes <i>dfr</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> e <i>sul3</i>	72
4.2.5. Estudo da variabilidade genética.....	74
V. Conclusões	77
VI. Bibliografia.....	79

Índice de Figuras

Figura 1: Imagem de <i>E. coli</i> em microscopia electrónica (MANNING, 2005).....	3
Figura 2: Fotografia do meio Levine a evidenciar colónias de <i>E. coli</i>	6
Figura 3: Locais de actuação dos diferentes antibióticos. Imagem adaptada de (ALBERTS, 2001).	9
Figura 4: Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos, adaptado de (SUÁREZ, 2009).....	11
Figura 5: Formação do peptidoglicano, imagem adaptada de (SUÁREZ, 2009).....	12
Figura 6: Mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos, imagem adaptada de (SUÁREZ, 2009).	12
Figura 7: Estrutura química do ácido nalidíxico e de seis fluoroquinolonas, adaptado de (WOLFFSON, 1985).	14
Figura 8: Estrutura de alguns aminoglicosídeos, adaptado de (KOTRA, 2000).....	17
Figura 9: Estrutura do sulfametoxazol e trimetoprim, respectivamente (MASTERS, 2003).	19
Figura 10: Esquema da via de síntese do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim, adaptado de (MASTERS, 2003, PHILIP A. MASTERS, 2003).....	20
Figura 11: Representação esquemática de alguns mecanismos de resistência antimicrobiana na bactéria.	21
Figura 12: Representação esquemática das diferentes formas de transferência de genes entre bactérias. A: Transformação, B: Transdução e C: Conjugação, imagem adaptada de (BARON, 1996).	24
Figura 13: Representação esquemática de um plasmídeo.	25
Figura 14: Imagem de microscopia electrónica de pequenos plasmídeos (BENNETT, 2008).....	25
Figura 15: Representação esquemática de uma sequência de inserção, constituída por uma transposase flanqueada por curtas sequências nucleotídicas invertidas.	26
Figura 16: Representação esquemática da região que flanqueia o ISCR1. <i>oriIS</i> e <i>terIS</i> delimitam o local de transposição (TOLEMAN, 2006a).....	27
Figura 17: Representação esquemática de um transposão Tn10.	28
Figura 18: Estrutura de um integrão de classe 1.....	29
Figura 19: Representação esquemática da inserção de uma cassette de genes e do mecanismo de expressão dos genes associados a um integrão, imagem adaptada de (HARBOTTLE, 2006).....	29
Figura 20: Representação esquemática das diferenças na parede celular de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, imagem adaptada de (ALBERTS, 2001).....	36

Figura 21: Coloração de Gram: Bactérias de Gram positivo (esquerda); Bactérias de Gram negativo (direita).	37
Figura 22: Fotografia de uma placa de meio Levine com colónias características de <i>E. coli</i>	37
Figura 23: A: Tubo com um pico ácido (amarelo) e um fundo ácido (amarelo), que indica tanto fermentação da glicose como da lactose. Notar também o espaço vazio que existe no fundo do tubo e a ruptura do agar no centro deste, o que indica a produção de gás (CO ₂) pelo microrganismo;.....	38
Figura 24: A formação de indol a partir de triptofano é indicada pelo aparecimento de uma cor vermelha após adição do reagente de Kovacs (KONEMAN, 1997).	39
Figura 25: A: Mostra uma reacção fortemente positiva, cor vermelha/rosa em todo o tubo, indicando a reacção alcalina produzida pela degradação da ureia;	39
Figura 26: O desenvolvimento no pico do agar de Citrato de Simmons e a viragem do indicador azul de bromotimol para uma cor azul alcalina indicam que o microrganismo pode utilizar o citrato de sódio como a única fonte de carbono (KONEMAN, 1997).	40
Figura 27: Identificação de <i>E. coli</i> pelo método clássico.	40
Figura 28: Fotografia de uma placa de antibiograma para <i>E. coli</i> com os antibióticos em cima referidos e respectivos halos de inibição.	42
Figura 29: Exames à urina num universo de 12662 amostras.	49
Figura 30: Percentagem do exame bacteriológico positivo e negativo de urina em 2282 exames realizados..	50
Figura 31: Microrganismos isolados nos exames bacteriológicos positivos em Outubro de 2008.	50
Figura 32: Exames à urina num universo de 10657 urinas.	51
Figura 33: Percentagem do exame bacteriológico positivo e negativo de urina em 1885 exames realizados..	51
Figura 34: Microrganismos isolados nos exames bacteriológicos positivos em Novembro de 2008.....	52
Figura 35: Exames à urina num universo de 8430 amostras de urina.	52
Figura 36: Percentagem do exame bacteriológico positivo e negativo de urina em 1718 exames realizados..	53
Figura 37: Microrganismos isolados nos exames bacteriológicos positivos em Dezembro de 2008.....	53
Figura 38: Média de idades dos doentes do sexo feminino e masculino que obtiveram um exame bacteriológico de urina positivo.	55
Figura 39: Percentagem dos doentes de sexo feminino e dos doentes de sexo masculino com exame bacteriológico de urina positivo.	55
Figura 40: Gráfico representativo das resistências de <i>E. coli</i> a penicilinas nos três meses de estudo.....	57
Figura 41: Gráfico representativo das resistências de <i>E.coli</i> a cefalosporinas nos três meses de estudo.	58

Figura 42: Gráfico representativo das resistências de <i>E. coli</i> a monobactâmicos, carbapenemos e amoxicilina + ácido clavulânico nos três meses de estudo.	59
Figura 43: Gráfico representativo das resistências de <i>E. coli</i> a aminoglicosídeos nos três meses de estudo...	60
Figura 44: Gráfico representativo das resistências de <i>E. coli</i> a quinolonas nos três meses de estudo.	61
Figura 45: Gráfico representativo das resistências de <i>E. coli</i> a sulfametoxazol + trimetoprim nos três meses de estudo.	62
Figura 46: Gráfico representativo dos antibióticos que apresentaram mais resistências em <i>E. coli</i> durante os três meses de estudo.	63
Figura 47: Resultados da pesquisa do gene <i>int1</i> em 25 isolados de <i>E. coli</i>	65
Figura 48: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação do gene da <i>int1</i> . M: Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; C+: Controlo positivo; 1-10: isolados de <i>E. coli</i>	65
Figura 49: Resultados da pesquisa da zona variável em 19 isolados de <i>E. coli int1</i> +.	66
Figura 50: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação da zona variável. M: Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; 7, 8, 11, 18, 19 e 25: isolados de <i>E. coli</i>	67
Figura 51: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação do gene <i>sul3</i> . M: Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; C+: Controlo positivo; 6 e 21: isolados de <i>E. coli</i>	70
Figura 52: Electroforese do produto resultante da amplificação utilizando o primer a ancorar no gene <i>Int1</i> e outro no gene <i>sul3</i> . M: Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; 6: isolado de <i>E. coli</i>	71
Figura 53: Electroforese dos produtos resultantes de ERIC-PCR. M: Marcador de peso molecular gene ruler 100pb.	74

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resumo das estirpes de <i>E. coli</i> que podem originar perturbações entéricas (KONEMAN, 1997). ...	5
Tabela 2: Características bioquímicas de <i>E. coli</i> nos meios clássicos.	40
Tabela 3: Antibióticos testados para estirpes de <i>E. coli</i> . A azul estão os antibióticos para os quais as estirpes de <i>E. coli</i> apresentaram mais resistências.	42
Tabela 4: Indicação da concentração final dos componentes da reacção de PCR.	43
Tabela 5: Sequência dos iniciadores para pesquisa do gene codificante da integrase de classe 1, das zonas variáveis, tamanho dos respectivos fragmentos e referência bibliográfica.	44
Tabela 6: Condições utilizadas nas reacções de amplificação de integrase de classe 1 e respectivas zonas variáveis.	44
Tabela 7: Sequência dos iniciadores para pesquisa dos genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> e <i>sul3</i> e respectiva referência bibliográfica.	44
Tabela 8: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> e <i>sul3</i>	45
Tabela 9: Sequência dos iniciadores para amplificação por ERIC-PCR e respectiva referência bibliográfica.	46
Tabela 10: Condições utilizadas nas reacções de amplificação por ERIC-PCR.	46
Tabela 11: Procedimento para a purificação de produtos de PCR.	47
Tabela 12: Constituição do tampão de carga e do TAE.	48
Tabela 13: Isolados positivos para a presença de integrões de classe 1, genes cassete amplificados e respectivo tamanho.	67
Tabela 14: Presença dos genes <i>sul</i> em 25 isolados de <i>E. coli</i>	71
Tabela 15: Resumo dos dados obtidos.	73

Lista de Abreviaturas

BOX – “Repetitive Intergenic sequence elements of *Streptococcus*”

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DNA – Desoxirribonucleico ácido

DHF – Ácido Dihidrofólico

DHPS – Enzima Dihidropteroato Sintetase

DHFR – Enzima Dihidrofolato Redutase

EAEC – *E. coli* Enteroagregativa

E. coli – *Escherichia coli*

EHEC – *E. coli* Enterohemorrágica

EIEC – *E. coli* Enteroinvasiva

EPEC – *E. coli* Enteropatogénica

ERIC – “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements”

ETEC – *E. coli* Enterotoxigena

Int – Enzima integrase

ISCR – Sequências de inserção com regiões comuns

ITU – Infecção do Tracto Urinário

KB – Kirby-Bauer

PABA – Ácido para-aminobenzóico

PBP – Proteína de ligação à Penicilina

pb – Pares de base

PFGE – Electroforese em campo pulsado

QRDR – Região determinante na resistência a Quinolonas

RAPD – “Random Amplified Polymorphic”

REP – “Repetitive Extragenic Palindromic elements”

RFLPs – Polimorfismo no tamanho do fragmento de DNA

SI - Sequências de inserção

SULs – Sulfonamidas

SxT - Sulfametoxazol + Trimetoprim

THF – Ácido tetrahidrofólico

TMP – Trimetoprim

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

I. Introdução

Na clínica infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos estão a tornar-se o problema global do século XXI.

Estas infecções são mais graves e requerem tratamentos mais longos e complexos. No passado a resistência a antibióticos foi um problema confinado ao ambiente hospitalar, estando associado a doentes imunodeprimidos contudo, actualmente já se estende à comunidade em geral (ALANIS, 2005).

Os antibióticos tem a capacidade de inibir o crescimento ou matar microrganismos, contudo estes podem disseminar resistência como uma forma de resposta aos antimicrobianos, de acordo com as leis de evolução e selecção natural. Assim, são diversos e complexos os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos (SIPAH, 2008). A resistência aos antimicrobianos é uma consequência de uma terapia inadequada e resulta em dificuldades crescentes no tratamento de infecções bacterianas.

A resistência conduz a terapias empíricas impróprias, tratamento eficaz mais tardio e ao uso de antibióticos menos eficazes, mais tóxicos e mais caros. De acordo com alguns estudos, a resistência antimicrobiana está associada a um fracasso no tratamento, hospitalização prolongada ou adicional, despesas aumentadas de cuidados médicos e aumento da mortalidade. Tudo isto tem um impacto directo nos pacientes e nas suas famílias. Desta forma, há uma necessidade urgente no controlo da resistência antimicrobiana (REYNOLDS, 2004, ZWAR, 1999).

O conhecimento prévio do provável microrganismo causador de infecção e o padrão de resistência esperado aumenta a probabilidade de seleccionar um antibiótico eficaz para o tratamento, evitando uma terapia empírica e impedindo o uso inadequado de dado antibiótico (SNARY, 2004).

O controlo das resistências passa por estratégias fundamentais, tais como, programas de controlo da infecção; vigilância epidemiológica e optimização da utilização de antibióticos (ZWAR, 1999).

1.1. Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae é uma família de microrganismos ubíquos que fazem parte da flora intestinal normal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos. Estas bactérias causam diversas doenças em humanos, incluindo septicemia (30 a 35% dos casos), 80% das infecções das vias urinárias adquiridas na comunidade e muitas infecções intestinais. Algumas espécies, como a *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia pestis* estão sempre associadas a doença nos seres humanos, enquanto outras (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) são membros da flora normal, que podem causar infecções oportunistas. As infecções podem ter origem num reservatório animal (por exemplo a maioria das espécies de *Salmonella* e *Yersinia*), num portador humano (por exemplo espécies de *Shigella*) ou por disseminação endógena dos microrganismos num paciente susceptível (por exemplo espécies de *Escherichia*), podendo afectar praticamente todas as partes do corpo (MIMS, 2004, RONALD, 2003).

Os membros desta família são bacilos de Gram negativo, móveis ou imóveis, dotados de flagelos peritríquios e não formam esporos (MIMS, 2004).

1.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli foi descoberta em 1885 por um bacteriologista alemão Theodor Escherich num estudo a um conjunto de bebés com inflamação do intestino. A bactéria inicialmente foi designada de *Bacterium coli*, mais tarde passou a designar-se *E. coli* em homenagem ao responsável pela sua descoberta.

E. coli pode sobreviver em diferentes ambientes, podendo ser isolada a partir do solo, da água e de organismos vivos tais como, plantas, humanos e animais. (MANNING, 2005).

O género *Escherichia* (Figura 1) inclui cinco espécies, sendo *E. coli* a mais comum e clinicamente a mais importante. É uma bactéria de Gram negativo, anaeróbio facultativo (MANNING, 2005).



Figura 1: Imagem de *E. coli* em microscopia electrónica (MANNING, 2005).

1.1.1.1. Factores de Virulência

As estirpes de *E. coli* responsáveis por doenças como a gastroenterite e as infecções das vias urinárias possuem factores de virulência especializados. Dois destes factores são as adesinas e as toxinas. As adesinas permitem que *E. coli* permaneça no tracto gastrointestinal ou nas vias urinárias permitindo a adesão aos tecidos que revestem estes tractos evitando a sua eliminação em consequência da motilidade intestinal e da acção do fluxo urinário.

E. coli também produz um espectro diverso de toxinas, responsáveis por diferentes tipos de doenças gastrointestinais. Por exemplo, as estirpes de *E. coli* enterotoxígenas são produtoras de dois tipos de toxinas (Termo-Lábil e Termo-Estável), responsáveis pela patogénese da infecção entérica (MANNING, 2005, YAMAMOTO, 2007).

1.1.1.2. Epidemiologia

E. coli está presente no tracto gastrointestinal e pode com alguma frequência ser responsável por septicemia, meningite neonatal, infecções das vias urinárias e gastroenterites. *E. coli* é responsável por 80% de todas as infecções urinárias adquiridas na comunidade (RONALD, 2003). Constitui uma causa proeminente de gastroenterite nos

países em desenvolvimento. As infecções (com exceção da meningite neonatal e gastroenterite) são, na maioria das vezes endógenas, ou seja, a flora microbiana normal do indivíduo é capaz de estabelecer uma infecção quando as defesas do hospedeiro se encontram comprometidas (INDIRA U. M.; SCOTT, 2006).

1.1.1.3. Manifestações Clínicas

Septicemia

Tipicamente, a septicemia causada por bacilos de Gram negativo, como *E. coli*, origina-se de infecções nas vias urinárias ou no tracto gastrointestinal. A mortalidade associada à septicemia por *E. coli* é influenciada pela fonte da infecção e pela doença subjacente ao paciente, com incidência significativamente maior em pacientes imunocomprometidos e naqueles que apresentam infecções intra-abdominais (MANGES, 2008)

Infecções das Vias Urinárias

Os bacilos de Gram negativo que provocam infecções das vias urinárias originam-se, na maioria dos casos, no cólon, contaminam a uretra, ascendem na bexiga e podem migrar para o rim (MANNING, 2005)

As infecções do trato urinário podem desenvolver-se em homens e mulheres, embora sejam mais comuns em mulheres. *E. coli* responsável por infecções urinárias designa-se de *E. coli* uropatogénica, que em alguns casos pode desenvolver pielonefrite, uma inflamação grave nos rins. Embora não seja muito comum é muito grave e pode levar à morte, principalmente em crianças (MANNING, 2005).

Meningite Neonatal

E. coli, juntamente com *Streptococcus* do grupo B, constituem a causa mais comum de meningite neonatal (MANNING, 2005).

Os recém nascidos são extremamente vulneráveis a infecções visto o seu sistema imune ainda se encontrar em desenvolvimento. Quando infectados por *E. coli* podem desenvolver meningite bacteriana, uma doença caracterizada pela inflamação das meninges ou das membranas que rodeiam o cérebro e a espinhal medula. Esta doença pode ser fatal e pode deixar consequências para toda a vida, nomeadamente surdez, cegueira e lesão cerebral (MANNING, 2005).

Gastroenterite

A transmissão de doença intestinal geralmente é fecal/oral, por comida e águas contaminadas como veículos de transmissão. Foram identificadas cinco tipos de *E. coli* que desenvolvem diferentes infecções intestinais em termos de mecanismos patogénicos: *E. coli* Enterotoxigena (ETEC), *E. coli* Enteropatogénica (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) (Tabela 1) (TURNER, 2006).

Tabela 1: Resumo das estirpes de *E. coli* que podem originar perturbações entéricas (KONEMAN, 1997).

Local de Acção	Doença	Modo de Acção
ETEC Intestino delgado	Diarreia do viajante; diarreia aquosa; vômitos; cólicas; náuseas; febre baixa.	Enterotoxinas termoestáveis e/ou termolábeis mediadas por plasmídeos que estimulam a hipersecreção de líquidos e electrólitos.
EIEC Intestino Grosso	Febre; cólica; diarreia aquosa com fezes sanguinolentas de pequeno volume.	Invasão mediada por plasmídeos e destruição das células epiteliais que revestem o colón.
EHEC Intestino Grosso	Colite hemorrágica com cólica abdominal intensa, diarreia aquosa inicial seguida de diarreia macroscopicamente sanguinolenta; pouca ou nenhuma febre.	Mediada por toxinas citotóxicas que interrompem a síntese de proteínas; toxinas codificadas por bacteriófagos lisogénicos.
EPEC Intestino Delgado	Diarreia do lactente com febre; náusea; vômitos; fezes não sanguinolentas.	Aderência mediada por plasmídeos e destruição das células epiteliais.
EAEC Intestino Delgado	Diarreia do lactente nos países subdesenvolvidos; diarreia aquosa persistente, com vômitos, desidratação e febre baixa.	Aderência agregativa mediada por plasmídeos, impedindo a absorção de líquido.

1.1.1.4. Isolamento e Identificação

E. coli pode crescer em condições de aerobiose ou anaerobiose numa variedade de meios de cultura classificados como não selectivos (por exemplo Gelose de Chocolate) e selectivos/diferenciais (por exemplo o meio Levine). Possui exigências nutricionais simples, fermenta a lactose, reduz nitratos a nitritos, é catalase positiva e oxidase negativa. A ausência da actividade da citocromo-oxidase é uma característica importante, visto que pode ser determinada rapidamente e utilizada para distinguir as Enterobacteriaceae (oxidase negativa) de muitos bacilos de Gram negativo não fermentadores (oxidase positiva) (MANNING, 2005).

As características morfológicas das culturas em meios selectivos diferenciais são utilizadas para identificar os membros da família Enterobacteriaceae. O meio Levine, utilizado no presente estudo, permite diferenciar os microrganismos que fermentam a lactose dos que não fermentam. As bactérias lactose positivas, como *E. coli* originam colónias violeta escuro, por acidificação do meio, com eventual aparecimento de brilho metálico (Figura 2). As bactérias não fermentadoras dão origem a colónias incolores ou ligeiramente rosa (BIOMÉRIEUX, 2003).

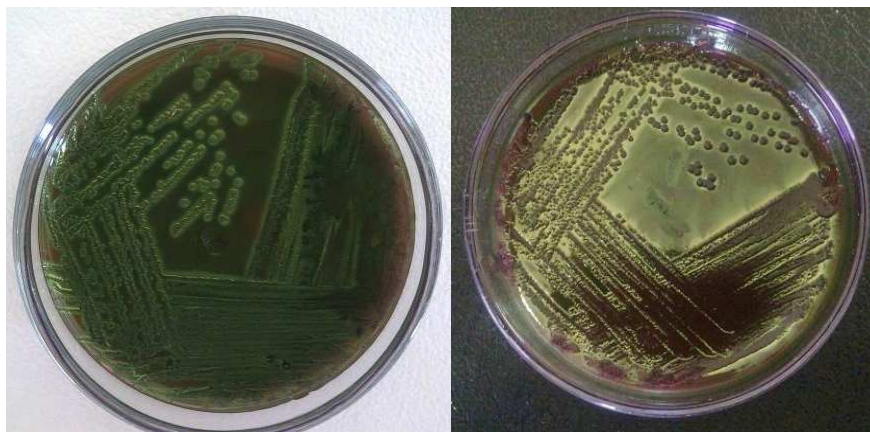


Figura 2: Fotografia do meio Levine a evidenciar colónias de *E. coli*.

1.1.1.5. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O estudo do comportamento de uma bactéria face aos antibióticos permite conhecer o seu perfil de sensibilidade ou resistência. Por observação do crescimento de uma população bacteriana em presença de gradientes de concentração de antibióticos podemos conhecer o antibiograma, aplicando as seguintes metodologias (KONEMAN, 1997):

1. **Métodos de diluição:** Podem ser realizados em meio líquido ou meio sólido e permitem determinar a concentração mínima inibitória (CMI) a um dado antibiótico;
2. **Métodos de difusão em meio sólido, pela técnica de Kirby-Bauer (KB):** Categoriza o microrganismo em Sensível, Intermédio e Resistente, em relação a dado antibiótico;
3. **Método de “E-Test”:** Permite quantificar a actividade microbiana perante determinado antibiótico, determinando a concentração inibitória mínima, através da técnica de difusão em meio de Muller-Hinton.
4. **Métodos automáticos:** Por exemplo o Sistema VITEK e o Sistema ATB. Estes métodos podem ser quantitativos (determinam a concentração inibitória mínima) ou qualitativos (classificação dos microrganismos em Sensível, Intermédio ou Resistente).

1.2. Antimicrobianos

Com a descoberta da penicilina, em 1926 por Fleming, numerosos antimicrobianos foram desenvolvidos e comercializados para uso clínico, o que diminuiu a mortalidade humana associada a infecções bacterianas. Porém, o optimismo inicial de que todas as infecções bacterianas poderiam ser tratadas com sucesso com esses novos agentes antimicrobianos terminou quando surgiram os primeiros relatórios de resistência bacteriana após a sua introdução na clínica. Estudos efectuados nos anos 50, sugeriam que as várias resistências observadas poderiam ser transferidas de bactéria para bactéria (HARBOTTLE, 2006).

A resistência antimicrobiana é actualmente a grande ameaça no público saudável e tem aumentado significativamente em infecções adquiridas na comunidade, como por exemplo infecções urinárias. Infecções do trato urinário causadas por *E. coli* resistente a antibióticos são sintomáticas por mais tempo em relação a infecções em que a *E. coli* é sensível aos antibióticos (BUTLER, 2007).

Iniciativas nacionais e internacionais focam-se numa consciencialização na prescrição de antibióticos. Estas iniciativas são baseadas no princípio que as bactérias resistentes são “mais fortes” em termos de selecção natural, quando comparadas com as bactérias sensíveis a dado antibiótico. Assim, reduzindo a utilização, generalizada e precoce, de uma terapêutica antimicrobiana de largo espectro há favorecimento do crescimento e selecção dos microrganismos sensíveis e uma redução na selecção de bactérias resistentes e, consequentemente, uma redução na resistência (BUTLER, 2007).

A determinação da susceptibilidade antimicrobiana é crucial para a terapia nos pacientes infectados. Esta necessidade está a aumentar juntamente com as resistências verificadas nos microrganismos. Estes testes não só são necessários para implementar uma terapia adequada com também para monitorizar o aumento de microrganismos resistentes a um dado antibiótico no ambiente hospitalar e no ambulatório (HARBOTTLE, 2006).

Actualmente, já são conhecidos muitos dos mecanismos de resistência antimicrobiana aos antibióticos que estão actualmente disponíveis para uso clínico (HARBOTTLE, 2006).

Assim a resistência antimicrobiana pode ser adquirida através de uma variedade de mecanismos (Figura 3): (i) presença de uma enzima que inactiva o agente antimicrobiano; (ii) presença de uma enzima alternativa à enzima que é inibida pelo agente antimicrobiano; (iii) mutação nos locais de actuação dos antibióticos; (iv) redução da captação do agente antimicrobiano; (v) presença de bombas de efluxo e (vi) superprodução de enzimas em que os seus locais de actuação estão inibidos pela presença do agente antimicrobiano (FLUIT, 2001).

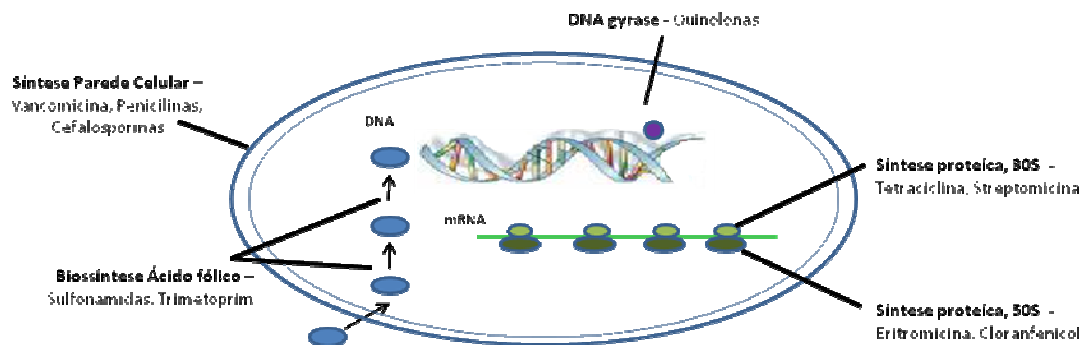


Figura 3: Locais de actuação dos diferentes antibióticos. Imagem adaptada de (ALBERTS, 2001).

1.2.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos apresentam como mecanismo de acção a inibição da última fase da síntese da parede celular bacteriana, constituem a mais numerosa família de antimicrobianos e os mais prescritos na prática clínica. São antibióticos de acção bactericida lenta, com actividade dependente do tempo, com uma boa distribuição corporal e, em geral, uma baixa toxicidade para o organismo (SUÁREZ, 2009).

Algumas modificações da molécula original originam compostos com maior espectro antimicrobiano, contudo o aparecimento de resistências limita a sua utilização, o uso empírico e a eficácia em determinadas situações. Apesar disto, a penicilina continua a ser o antibiótico de eleição numa grande variedade de infecções (SUÁREZ, 2009).

Dada a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade, para o tratamento de infecções causadas por *E. coli* são frequentemente prescritos antibióticos β -lactâmicos, (SMET, 2008).

Os antibióticos β -lactâmicos são divididos em seis grupos diferentes, as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, cefamicinas, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases (SMET, 2008).

1.2.1.1. Classificação e estrutura química

A presença do anel β -lactâmico define quimicamente esta família de antibióticos.

Este anel determina o mecanismo de acção, a escassa toxicidade e o principal mecanismo de resistência. A escassa toxicidade verifica-se uma vez que a sua acção é na parede celular do microrganismo e não na parede da célula eucariótica do ser humano. O principal mecanismo de resistência é devido à presença de β -lactamases, que clivam o anel β -lactâmico.

Para que o anel β -lactâmico seja activo, precisa de estar unido a outros radicais e as diferentes associações resultam em diferentes grupos de antibióticos β -lactâmicos (Figura 4). Dentro de cada grupo, pequenas alterações na estrutura química permitem modificar as características do antibiótico, como o seu espectro, a afinidade por determinados receptores e a resistência a β -lactamases (SUÁREZ, 2009).



Figura 4: Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos, adaptado de (SUÁREZ, 2009).

1.2.1.2. Mecanismo de acção

Os antibióticos β -lactâmicos são agentes bactericidas que actuam principalmente por duas etapas: inibição da síntese da parede celular e indução da autólise bacteriana.

A parede celular bacteriana é uma estrutura que envolve as bactérias de todos os géneros, excepto o *Mycoplasma*. Nas bactérias de Gram positivo, a parede celular é mais espessa e composta principalmente por peptidoglicano, enquanto nas bactérias de Gram negativo, a parede celular é mais fina e complexa, revestida por uma membrana externa constituída por lípidos e proteínas e por uma camada interna de peptidoglicano (SUÁREZ, 2009).

O peptidoglicano é constituído por cadeias lineares de glúcidos formadas pela repetição de moléculas de ácido-N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, dispostos alternadamente e unidos por ligações glicosídicas. Os diferentes componentes do peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana citoplasmática para o espaço periplasmático. A última fase da síntese do peptidoglicano é a formação de tetrapéptidos, pela perda de um dos aminoácidos terminais por acção das enzimas que se localizam no espaço periplasmático, as transpeptidases. Este processo designa-se de transpeptidação (Figura 5). O anel β -lactâmico apresenta uma estrutura

semelhante à região onde se ligam estas enzimas, sendo capaz de se unir covalentemente às enzimas e impedir a formação da parede celular. Por esta razão, as enzimas designam-se de PBP (Figura 6) (Penicilin Binding Protein).

Em suma, para que os antibióticos β -lactâmicos actuem é necessário que a bactéria se encontre na fase de multiplicação, mais precisamente na fase de síntese da parede celular (SUÁREZ, 2009).

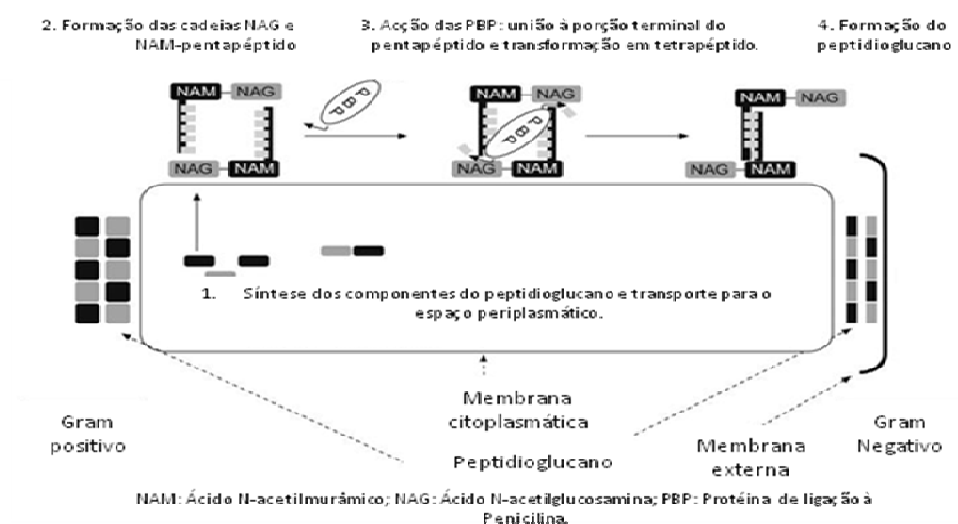


Figura 5: Formação do peptidoglicano, imagem adaptada de (SUÁREZ, 2009).

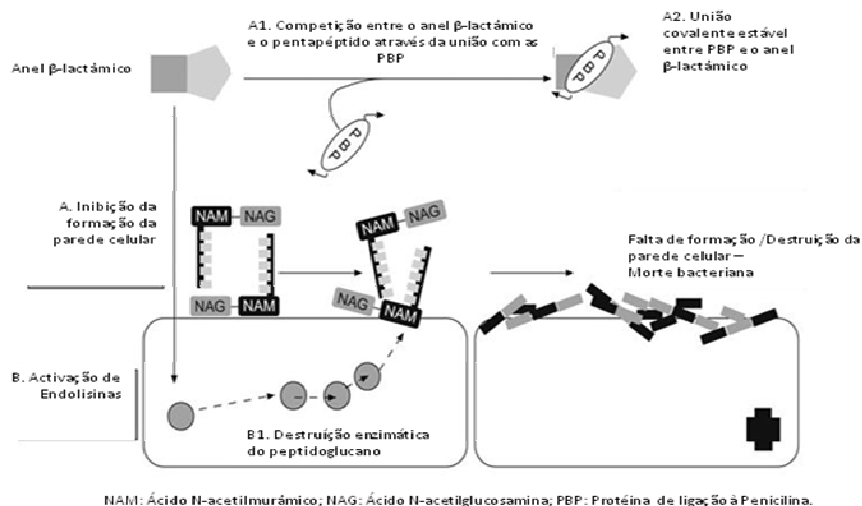


Figura 6: Mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos, imagem adaptada de (SUÁREZ, 2009).

1.2.1.3. Mecanismos de resistência

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos β -lactâmicos por três mecanismos diferentes.

- (i) Produção de enzimas, β -lactamases. Representa o principal mecanismo de resistência frente aos β -lactâmicos. As β -lactamases são enzimas que hidrolizam o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico antes da sua união com as PBP's (FLUIT, 2004, FLUIT, 2001, PITOUT, 2005).
- (ii) Modificações nas PBP's. Diferentes alterações nas PBP's, como mutações, aumento da expressão e modificações de afinidade, podem dificultar a união do anel β -lactâmico à proteína, diminuindo a sua actividade (FLUIT, 2001).
- (iii) Alterações na permeabilidade e bombas de efluxo (FLUIT, 2001).

1.2.2. Quinolonas

Nos últimos anos, o tratamento das ITU começou a ser problemático devido às resistências observadas nos microrganismos causadores da infecção. Este fenómeno envolve as quinolonas, um grupo de antibióticos sintéticos de extrema importância no tratamento de diversas infecções (PIATTI, 2008).

A descoberta acidental de um subproduto da síntese da cloroquina, o 6-cloro-1-H-etil-4-oxoquinolona-3-ácido carboxílico, levou à síntese do ácido nalidíxico, o precursor de uma nova classe de antimicrobianos, as quinolonas. Por apresentar actividade contra bactérias de Gram negativo, o ácido nalidíxico constituiu uma boa opção terapêutica para o tratamento de infecções urinárias nos anos 60 (APPELBAUM, 2000).

Nos anos 70, outras quinolonas, como o ácido oxolínico e a cinoxacina, foram sintetizadas. Apesar de possuírem actividade antimicrobiana superior à do ácido nalidíxico, tais compostos não representaram uma descoberta significativa. Porém, nesse mesmo período, a síntese do ácido pipemídico, com a inclusão de um átomo de flúor na posição 6,

levaram à síntese da norfloxacin nos anos 80, o primeiro composto do grupo das fluoroquinolonas (APPELBAUM, 2000).

1.2.2.1. Classificação e estrutura química

As quinolonas estão relacionadas com o ácido nalidíxico e apresentam em comum o núcleo com a estrutura 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. O nitrogénio na posição 1 e o grupo carboxilo na posição 3 são indispensáveis para a actividade antibacteriana. As fluoroquinolonas possuem um átomo de flúor na posição 6 e um anel piperacina (norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacin) ou metilpiperacina (ofloxacina, pefloxacina e aminofloxacina) na posição 7. Diferenciam-se entre si pelo radical na posição N-1 no núcleo principal e pelo radical unido ao grupo piperacina (Figura 7).

Alguns dos radicais relacionam-se directamente com características diferentes de cada molécula, por exemplo, o grupo carboxilo na posição 3 e a cetona na posição 4 são os lugares de união do DNA à DNA girase, o flúor na posição 6 aumenta a capacidade de penetração para o interior da bactéria e melhora a afinidade pela DNA girase (MELLA, 2000).

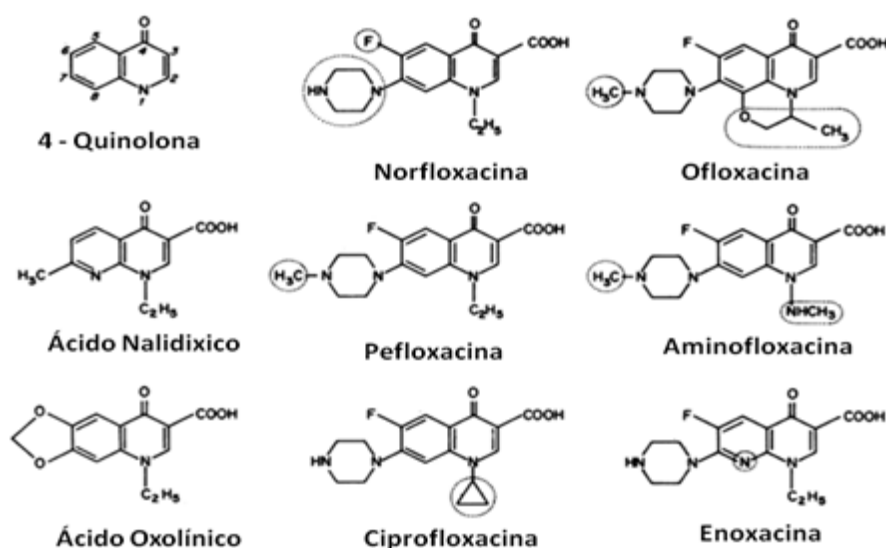


Figura 7: Estrutura química do ácido nalidíxico e de seis fluoroquinolonas, adaptado de (WOLFFSON, 1985).

1.2.2.2. Mecanismo de acção

O primeiro alvo das quinolonas é a DNA girase (topoisomerase II). Esta enzima essencial no mecanismo de acção das quinolonas foi descoberta em 1976 em *E. coli*, por Gellert (WOLLFSON, 1985).

As quinolonas inibem a síntese do DNA pela sua ligação a duas enzimas relacionadas mas funcionalmente diferentes, a DNA girase (topoisomerase tipo II) e a topoisomerase tipo IV. A DNA girase é o principal alvo nas bactérias de Gram negativo e a topoisomerase IV é o alvo preferencial em bactérias de Gram positivo (FLUIT, 2004, PIATTI, 2008).

A enzima DNA girase é composta, nas bactérias, por duas subunidades A, codificadas pelo gene *gyrA* e duas subunidades B codificadas pelo gene *gyrB* e tem como função alterar a configuração da dupla cadeia de DNA dentro da célula. (FLUIT, 2001, HOOPER, 1989). A inibição da sua actividade pelas quinolonas está associada com a morte da célula bacteriana (FLUIT, 2001).

As quinolonas exercem a sua função ao ligarem-se ao complexo formado pela DNA girase e o DNA, interferindo de forma directa com o processo de superenrolamento negativo do DNA. Ao impedir o superenrolamento o DNA perde a sua estrutura e não tem espaço suficiente no interior da célula. A célula adquire um aspecto filamentosos e sofre lise pelas suas próprias autolisinas (HOOPER, 1989, LI, 2005).

1.2.2.3. Mecanismos de resistência

As bactérias desenvolvem resistências à acção das quinolonas por quatro mecanismos:

(i) A alteração da DNA girase parece ser o factor determinante de resistência e consiste em mutações numa zona específica designada QRDR “*Quinolone Resistance-Determining Region*”. A QRDR fica próxima do aminoácido Tyr122, onde se dá a união das quinolonas. Apesar de interagirem primeiro com a subunidade A da DNA girase, estão descritas mutações na subunidade B que conferem resistências a este grupo de antibióticos em alguns microrganismos, como *E. coli*. A frequência das mutações no gene *gyrB* é menor, quando comparada com as mutações no gene *gyrA* (FLUIT, 2001).

(ii) As quinolonas necessitam de atravessar a parede celular para exercerem a sua função, alterações na parede celular das bactérias de Gram negativo, estão associadas com o aumento da resistência a estes antibióticos (FLUIT, 2001, LI, 2005).

(iii) Outro mecanismo presente em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo são os sistemas de bombas de efluxo, que expulsam o composto para fora da célula (FLUIT, 2001, LI, 2005).

(iv) A resistência pode ainda ser mediada por genes *qnr* localizados em elementos genéticos móveis, os plasmídeos (LI, 2005).

1.2.3. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma família de antibióticos potentes e com um espectro de acção alargado que se distinguem pela sua acção bactericida e actividade contra as Enterobacteriaceae e outros microrganismos de Gram negativo de importância clínica.

A estreptomicina, o primeiro a ser introduzido, em 1944, seguido de uma série de compostos, a canamicina, gentamicina e tobramicina, de extrema importância no tratamento de infecções por bacilos de Gram negativo. Em 1970, os aminoglicosídeos semi-sintéticos, como a amicacina e netilmicina mostraram a possibilidade de obter compostos activos contra as resistências observadas aos primeiros compostos (LECLERCQ, 1999).

A maioria destes antibióticos são bactericidas, apresentam uma farmacocinética previsível e actuam frequentemente em sinergia com outros antibióticos, o que os torna uma mais valia para o tratamento de doenças infecciosas (KOTRA, 2000).

1.2.3.1. Classificação e estrutura química

Os aminoglicosídeos são açúcares com grupos amina, ligados entre si por ligações glicosídicas (Figura 8). A maior parte deles são constituídos por três açúcares. São bases fracas, que se comportam como poliecátions (várias cargas positivas e negativas) ao pH fisiológico, o que explica a sua fácil dissolução em água (KOTRA, 2000).

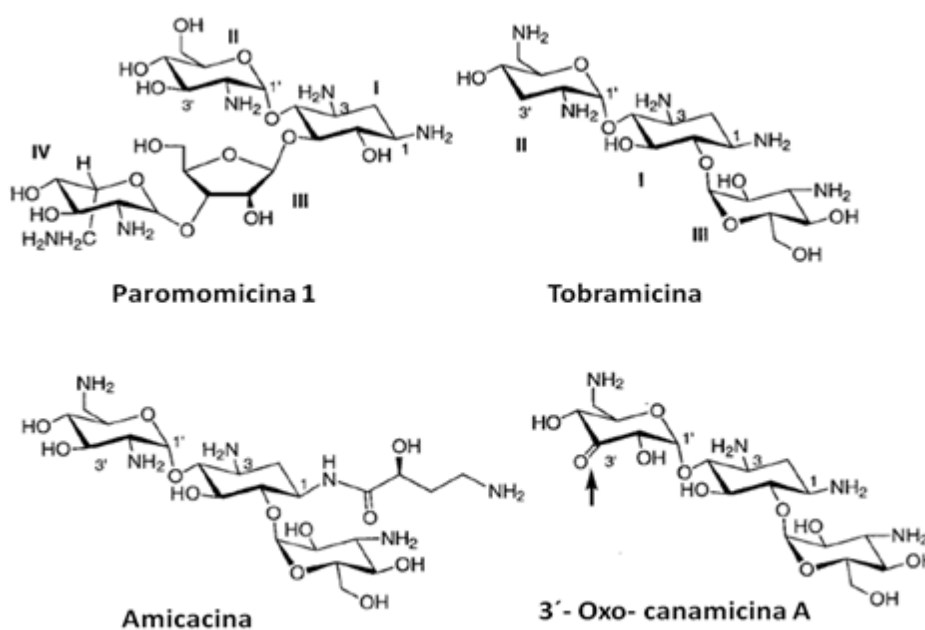


Figura 8: Estrutura de alguns aminoglicosídeos, adaptado de (KOTRA, 2000)

1.2.3.2. Mecanismos de acção

Os aminoglicosídeos são bactericidas que inibem a síntese proteica e actuam independentemente da fase em que se encontra a célula bacteriana.

Para exercer o seu efeito é necessário que o antibiótico penetre, principalmente por transporte activo, na célula bacteriana. Uma vez dentro da célula inibem a síntese proteica interagindo com a subunidade 30S do ribossoma, interferindo com o RNA mensageiro e induzindo erros de tradução formação de complexos de iniciação incorrectos (KOTRA, 2000).

1.2.3.3. Mecanismos de resistência

O aparecimento de resistências aos aminoglicosídeos reduziu as terapias empíricas com este grupo de antibióticos. Alterações no local de ligação ao ribossoma causam resistências apenas à estreptomicina. Outros mecanismos de resistência que podem afectar todos os aminoglicosídeos são a captação diminuída do antibiótico e alterações na expressão de enzimas que podem modificar o modo de actuação destes antibióticos (KOTRA, 2000).

1.2.4. Sulfonamidas e Trimetoprim

As sulfonamidas (SULs) foram a primeira classe de agentes antimicrobianos introduzidas na clínica em 1935. O trimetoprim (TMP) foi introduzido em 1962 e a sua combinação, Sulfametoxazol – Trimetoprim (SxT), teve início em 1968 com Bushby e Hitchings, os primeiros a descreverem o aumento da actividade de sulfametoxazol combinado com trimetoprim (MARCIA, 1990). O espectro antimicrobiano da combinação de ambos é dirigido para a *E. coli*, outras espécies da família Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* e *Moraxella catarrhalis* (NOJA, 2008).

As SULs administradas isoladamente têm um efeito bacteriostático, impedindo o crescimento bacteriano por carência de ácido fólico, indispensável para o crescimento celular (MARCIA, 1990).

A combinação SxT tem um efeito bactericida é mais utilizada em infecções urinárias e infecções do trato respiratório superior (NOJA, 2008).

1.2.4.1. Classificação e estrutura química

Sulfametoxazol e trimetoprim usam-se em associação e na proporção de 1:5 (MASTERS, 2003). A sua estrutura é evidenciada na figura 9.

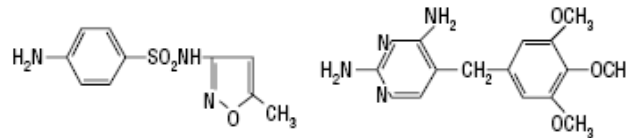


Figura 9: Estrutura do sulfametoxazol e trimetoprim, respectivamente (MASTERS, 2003).

1.2.4.2. Mecanismo de acção

São antibióticos antimetabolitos que impedem a biosíntese dos co-factores folato, indispensáveis para a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas. Os dois compostos em associação impedem duas etapas sucessivas da mesma via metabólica.

No processo, esquematizado na figura 10, a célula bacteriana incorpora ácido para-aminobenzóico (PABA) + pteridina no ácido hi-hidropteróico, pela acção da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS). O ácido dihidropteróico + glutamato, pela acção da enzima DHPS vai produzir ácido dihidrofólico (DHF). O DHF pela acção da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) vai produzir o ácido tetrahidrofólico (THF). Este ácido funciona como co-enzima que transfere um átomo de carbono de uma molécula para outra, sendo uma reacção essencial para a síntese de timidina, nucleótidos de purina e glicina+metionina, indispensáveis para a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas (HUOVINEN, 1995, SKOLD, 2001).

As SULs são um inibidor competitivo da enzima DHPS, estas competem com PABA, dada a sua analogia estrutural com a enzima DHPS. O TMP é um potente inibidor competitivo de DHFR, uma vez que é um análogo estrutural da porção pteridina do DHF (HUOVINEN, 1995, SKOLD, 2001).

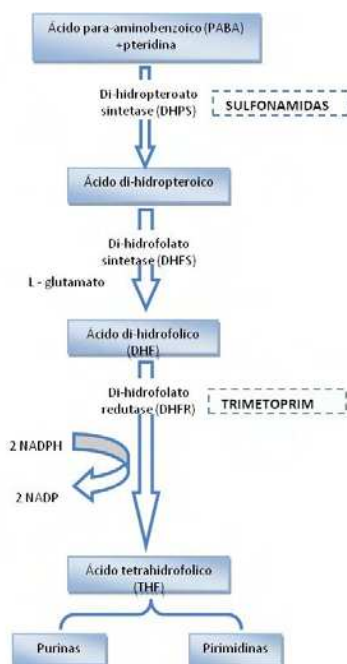


Figura 10: Esquema da via de síntese do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim, adaptado de (MASTERS, 2003, PHILIP A. MASTERS, 2003)

1.2.4.3. Mecanismo de resistência

No começo de 1970 sulfametoxazol e trimetoprim demonstraram um elevado espectro de actividade contra bactérias aeróbias. A sua eficácia antimicrobiana e o baixo custo rapidamente fizeram com que se tornassem antibióticos de eleição para o tratamento de infecções urinárias, infecções do tracto respiratório superior e infecções gastrointestinais. No entanto, as crescentes taxas de resistência entre os isolados microbianos foram aumentando durante as últimas décadas (MASTERS, 2003).

A bactéria pode tornar-se resistente ao sulfametoxazol e trimetoprim por vários mecanismos:

- (i) Desenvolvimento de barreiras na permeabilidade da membrana;
- (ii) Bombas de efluxo;
- (iii) Modificações nos locais de ligação às enzimas;
- (iv) Desregulação na expressão dos genes que codificam as enzimas alvo (MASTERS, 2003).

1.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana

A bactéria pode utilizar vários mecanismos para escapar à acção letal dos antimicrobianos e a existência de vários mecanismos em simultâneo pode conduzir a multiresistência bacteriana. Alguns desses mecanismos estão representados na figura 11 (DEPARDIEU, 2007).

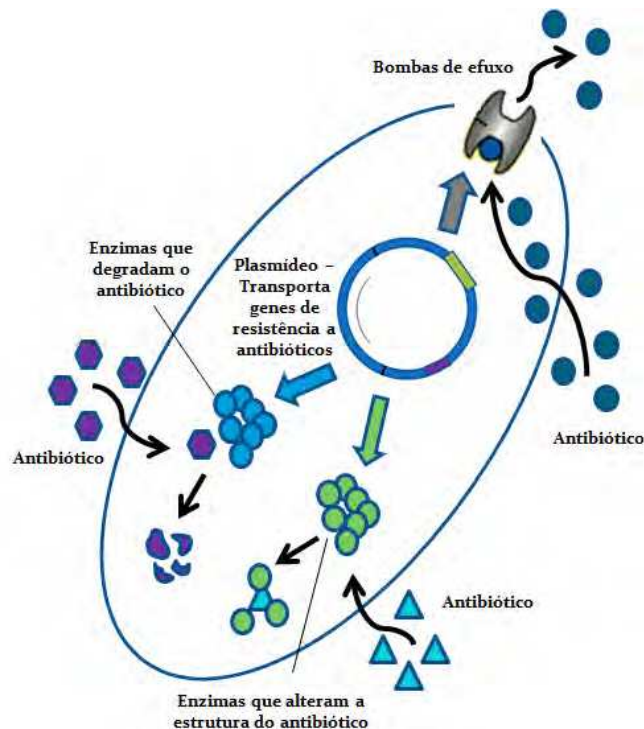


Figura 11: Representação esquemática de alguns mecanismos de resistência antimicrobiana na bactéria.

A resistência a determinado antibiótico pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida.

A **resistência intrínseca** faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, transmitida apenas verticalmente de geração em geração. Faz parte da herança genética do microrganismo.

O maior determinante de resistência intrínseca é a presença ou ausência do alvo para a acção da droga. Por exemplo, a relação entre os antibióticos inibidores da síntese da parede celular, como as penicilinas e o género *Mycoplasma*. Estes microrganismos não possuem

parede celular, logo estes antibióticos não encontram alvo para a sua acção. Essa característica fenotípica é transmitida verticalmente de geração em geração.

A resistência intrínseca não apresenta qualquer risco à terapêutica, pois é previsível, bastando-se conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de acção dos antibióticos disponíveis clinicamente (MARTINEZ, 2002, SUMMERS, 2006)

A **resistência adquirida** ocorre quando há o aparecimento de resistência numa espécie bacteriana anteriormente sensível ao antibiótico em questão. É uma "nova" característica manifestada na espécie bacteriana, característica que está ausente nas células progenitoras. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossómicas ou extra-cromossómicas, por exemplo os plasmídeos (MARTINEZ, 2002, SUMMERS, 2006).

A aquisição de resistência tem diminuído muito a eficácia de importantes antibióticos, impulsionando estudos para a pesquisa de novos antibióticos, associações ou esquemas terapêuticos.

1.3.1. Transferência de genes entre bactérias

A transferência de genes de resistência ocorre quando um dado microrganismo recebe material genético de outro microrganismo, passando a expressar a característica contida no gene recentemente adquirido. Esse material genético que contém a informação que expressa a resistência pode ser transferido por transformação, transdução e conjugação (SUMMERS, 2006).

A partir destes mecanismos as bactérias podem adquirir e/ou transferir resistência a outras bactérias, transferindo-lhes a propriedade de defesa contra determinado antimicrobiano.

1.3.1.1. Transformação

A transformação é um processo de incorporação de DNA exógeno proveniente, por exemplo, da lise de determinado microrganismo com libertação do seu material genético, ficando este disponível para que outra bactéria o incorpore no seu genoma. Esse DNA pode ser originário do cromossoma, de plasmídeos ou ainda de bacteriófagos e para que o processo ocorra a bactéria receptora tem de estar apta a receber esse material, no estado de competência, quando sintetiza proteínas de superfície que estabelecem a ligação ao DNA (Figura 12) (SUMMERS, 2006).

1.3.1.2. Transdução

A transdução envolve a incorporação accidental do DNA bacteriano cromossômico ou plasmídico por um bacteriófago durante o processo de infecção celular. Após a lise celular, o bacteriófago actua como um vector e ao infectar uma célula nova pode introduzir o DNA contendo o(s) gene(s) de resistência, tornando-a resistente a determinado antibiótico. Teoricamente ocorre somente entre bactérias da mesma espécie (Figura 12) (SUMMERS, 2006).

1.3.1.3. Conjugação

A conjugação é um processo que requer contacto entre bactérias, em que uma das bactérias actua como dadora, transferindo através de um pilus sexual o material genético a outra célula, a célula receptora (Figura 12) (SUMMERS, 2006).

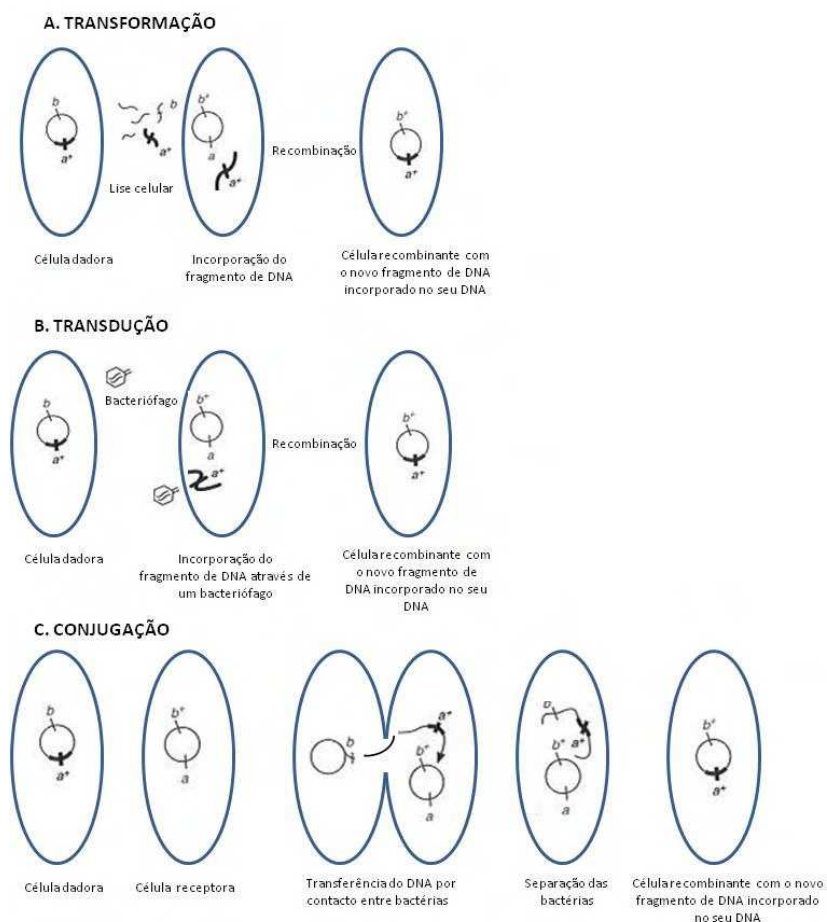


Figura 12: Representação esquemática das diferentes formas de transferência de genes entre bactérias. **A:** Transformação, **B:** Transdução e **C:** Conjugação, imagem adaptada de (BARON, 1996).

1.3.2. Elementos genéticos móveis

O movimento dos genes de resistência a antimicrobianos pode ser dividido em dois níveis, o nível intracelular e o nível intercelular, estando diferentes elementos envolvidos em um destes níveis.

Ao nível intracelular estes genes podem mover-se dentro do genoma, incluindo do cromossoma para plasmídeos e vice-versa. No caso do movimento intercelular, estão envolvidos os mecanismos atrás referidos, transdução, conjugação e transformação.

1.3.2.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA de cadeia dupla, extracromossomais, que possuem a capacidade de replicação autônoma (Figura 13 e 14). São importantes veículos de transporte e mobilização de genes que, em alguns casos, permitem à bactéria uma melhor adaptação ao ambiente que colonizam ou em que se encontram (BENNETT, 2008).

Os plasmídeos não são essenciais à sobrevivência bacteriana, apenas transportam genes que conferem características vantajosas à bactéria, como por exemplo, determinantes de virulência, de adesão e genes de resistência a antibióticos. Plasmídeos que transportam genes de resistência designam-se de plasmídeos R (HARBOTTLE, 2006).

Para além de transportarem genes de resistência, os plasmídeos podem servir como veículos para outros elementos genéticos móveis, como os transposões e integrões (HARBOTTLE, 2006).

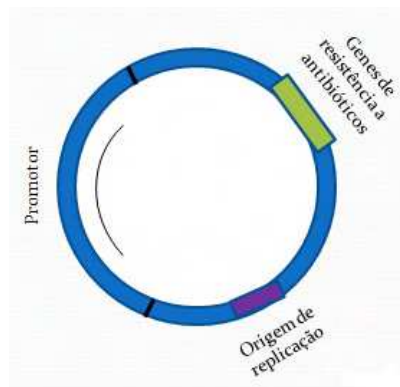


Figura 13: Representação esquemática de um plasmídeo.

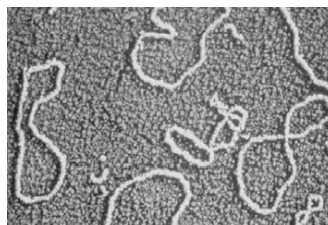


Figura 14: Imagem de microscopia electrónica de pequenos plasmídeos (BENNETT, 2008).

1.3.2.2. Sequências de Inserção

Sequências de Inserção (SI) são pequenos segmentos de DNA com um comprimento de 1-2 kb. São os elementos genéticos transponíveis mais simples e não estão directamente associadas à resistência a antibióticos. Tipicamente são constituídas por um gene que codifica a enzima transposase, flanqueado por curtas sequências nucleotídicas (10-40pb) invertidas nos extremos, como ilustrado na Figura 15 (WAGNER, 2006).

A transposase reconhece as sequências invertidas e repetições idênticas noutros locais do cromossoma e permite a excisão e a inserção destes fragmentos de DNA para um novo local e é também responsável pelo início da replicação (TOLEMAN, 2006b).

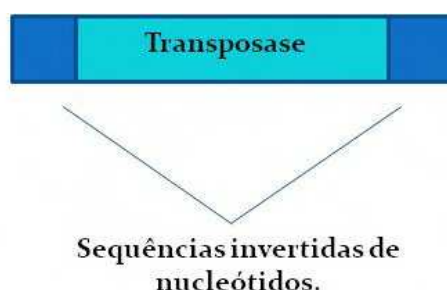


Figura 15: Representação esquemática de uma sequência de inserção, constituída por uma transposase flanqueada por curtas sequências nucleotídicas invertidas.

Recentemente foi identificada uma nova classe de elementos genéticos móveis, semelhantes com o IS91. Este foi designado por “Insertion Sequences Common Regions” (**ISCR**), dada à sua relação com os elementos das SI e à presença de uma sequência conservada designada de recombinase, a “common region”, que facilita a sua identificação (BOERLIN, 2008).

Os ISCRs são caracterizados por possuírem um gene semelhante à transposase, contudo, esta não está presente. Por outro lado, não apresentam as sequências invertidas típicas que flanqueiam as sequências de inserção. São delimitadas por sequências designadas de *oriIS* e *terIS* (origem e terminação da replicação) e o seu processo da transposição é em círculo rolante, uma característica muito diferente das sequências de inserção clássicas (Figura 16) (BOERLIN, 2008).

Os ISCRs parecem estar envolvidos na disseminação de uma variedade de genes de resistência a antibióticos e na evolução de integrões complexos (BOERLIN, 2008).

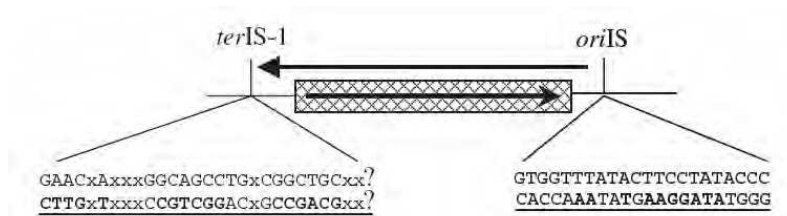


Figura 16: Representação esquemática da região que flanqueia o ISCR1. *oriIS* e *terIS* delimitam o local de transposição (TOLEMAN, 2006a).

1.3.2.3. Transposições

Os transposições são elementos genéticos móveis que necessitam de bacteriófagos ou mais frequentemente de plasmídeos para passarem de uma célula para outra. Podem conter genes de resistência a antibióticos e transferir-se para uma nova posição no cromossoma ou para um plasmídeo. Inserem-se aleatoriamente no genoma sendo a transposição o mecanismo que descreve a transferência de segmentos cromossomais, de uma posição para outra. Conhecem-se dois mecanismos de transposição, a replicativa, na qual se forma uma cópia do elemento transponível. Uma das cópias permanece no sítio original e a outra cópia move-se e insere-se num novo local e a transposição conservativa em que o elemento original se excisa, movendo-se para um outro local.

Os transposições podem ser simples, compostos apenas por SI e a transposase, sendo designados de SI ou mais complexos, contendo genes de resistência a antibióticos flanqueados por SI com sequências similares e habitualmente com orientações opostas, como por exemplo Tn10, que transporta o gene de resistência à tetraciclina, Tn3 (resistência à ampicilina) ou Tn9 (resistência ao cloranfenicol) (Figura 17) (HARBOTTLE, 2006, SUMMERS, 2006).

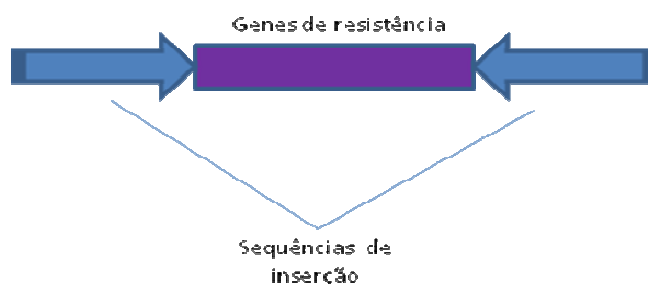


Figura 17: Representação esquemática de um transposon Tn10.

1.3.2.4. Integrões

Os integrões foram definidos por Hall e Collis como sistemas de captura de genes de resistência com sistemas de recombinação sítio específicos que reconhecem e captam cassetes móveis de genes. Um integrão inclui o gene que codifica a enzima integrase (*intI*), um sítio de recombinação adjacente (*attI*) e um promotor (Pc), que leva à transcrição dos genes dentro da região variável. As cassetes de genes não fazem parte da estrutura base do integrão, passando a fazer parte da sua constituição apenas quando são integradas.

Entre o gene *intI* e o local de recombinação *attI* encontram-se os promotores divergentes P1 para a expressão da integrase e Pc' para a expressão das cassetes de genes inseridas na zona variável do integrão. O gene *intI* permite a interação entre o local *attI* e o local *attC* das cassetes de genes, unindo ambos os sítios e facilitando a integração e a excisão das cassetes de resistência na zona variável do integrão (FLUIT, 2004, SUMMERS, 2006).

Os integrões podem ser divididos em dois grandes grupos: (i) os integrões de resistência e (ii) superintegrões. Os integrões de resistência transportam cassetes de genes que codificam a resistência a antibióticos e podem estar localizados no cromossoma ou em plasmídeos (FLUIT, 2004).

São conhecidas quatro classes de integrões (classe 1, 2, 3 e 4), distinguíveis pelos genes que codificam para a integrase (*int*). A classe 1 é a mais abundante e a mais frequente em bactérias de Gram negativo. A classe 4 é uma classe diferente, localizada no

genoma do *Vibrio cholerae* (FLORENCE DEPARDIEU, 2007). Todas as classes apresentam uma região variável flanqueada pelas regiões conservadas 5' (5'CS) e 3' (3'CS). A região 5' apresenta o gene *int*, *attI* e o promotor. A região 3' é constituída pelos genes *qacEΔ1*, que codifica a resistência a compostos de amônio quaternário e brometo de etídio e *sulI* que codifica a resistência a sulfonamidas. Entre os extremos 5'CS e 3'CS encontra-se uma zona variável com a presença ou ausência de cassetes de genes de resistência a antibióticos (Figuras 18 e 19) (FLUIT, 2004).

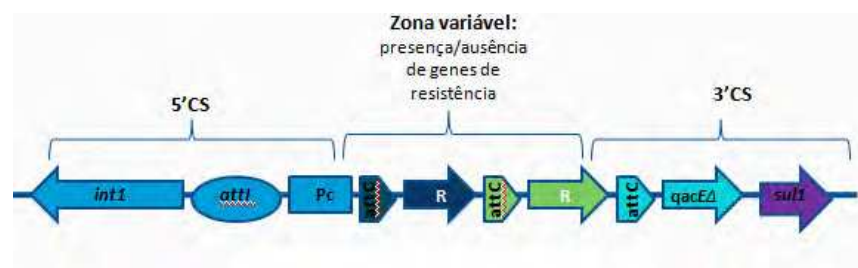


Figura 18: Estrutura de um integrão de classe 1.

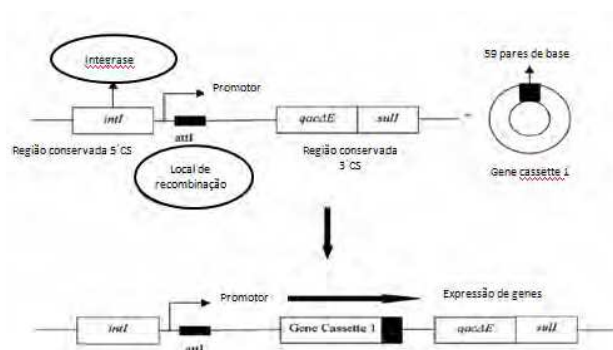


Figura 19: Representação esquemática da inserção de uma cassette de genes e do mecanismo de expressão dos genes associados a um integrão, imagem adaptada de (HARBOTTLE, 2006).

1.4. Genotipagem

A tipagem de microrganismos progrediu consideravelmente nos últimos anos como resultado do desenvolvimento de técnicas moleculares que permitem evidenciar as diferenças entre encontradas a nível do genoma (FOXMAN, 2005, SINGH, 2006).

Antes do desenvolvimento das diversas técnicas de tipagem molecular, os isolados bacterianos eram distinguidos com base em comparações fenotípicas que se baseavam em testes morfológicos e bioquímicos, sensibilidade a fagos, sensibilidade a bacteriocinas, perfis imunológicos e perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Embora este conjunto de testes permitisse uma boa determinação do género e espécie, a obtenção da sub-espécie era muito limitada (FOXMAN, 2005).

O cromossoma bacteriano é o componente fundamental de identidade da célula, sendo por isso, o mais utilizado no estudo sobre a relação existente entre diferentes bactérias (SINGH, 2006).

Os métodos de tipagem molecular permitem analisar uma parte ou a totalidade do genoma. Baseiam-se na comparação do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados a partir do genoma de diversos organismos. A tipagem molecular, baseada na análise de ácidos nucleicos é dividida maioritariamente em (i) Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico, como por exemplo a análise por electroforese em campo pulsado (PFGE) e (ii) Técnicas de tipagem baseadas em PCR. No entanto, é de salientar, que o custo e o tempo que estas técnicas requerem limitam a sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos (FOXMAN, 2005, SINGH, 2006).

A análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico consiste na digestão do DNA total com enzimas de restrição, originando fragmentos de diferentes tamanhos que formam diferentes padrões quando separados num gel de agarose, o que se designa de polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs). Contudo, é de salientar que fragmentos com tamanho superior a 40Kb não migram correctamente no gel de agarose. Neste caso, a PFGE, que periodicamente altera a direcção do campo eléctrico onde o DNA é separado, permite a separação de fragmentos com tamanho superior a 1000kb (SINGH, 2006).

As técnicas de tipagem baseadas em PCR são técnicas que permitem a obtenção de elevadas quantidades de uma dada sequência do DNA em estudo (SINGH, 2006)

Existem vários métodos de tipagem baseados na técnica de PCR: (i) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), (ii) REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements), (iii) ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements), e (iv) BOX (Repetitive Intergenic Sequence Elements of *Streptococcus*) (MICHELIM, 2008).

A tipagem molecular é muito importante e muito utilizada em estudos de biodiversidade, em que os resultados obtidos permitem observar a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos e detectar surtos causados por essas bactérias (FOXMAN, 2005).

II. Objectivos

As infecções do tracto urinário são as mais frequentes na comunidade sendo *Escherichia coli* o principal microrganismo responsável.

A resistência antimicrobiana começou por ser um problema apenas a nível hospitalar, actualmente, com o aumento do consumo de antibióticos e com as dificuldades crescentes no tratamento de infecções bacterianas, é a grande ameaça no público saudável. A resistência antimicrobiana tem aumentado significativamente em infecções adquiridas na comunidade, como por exemplo as infecções urinárias.

Para este estudo foram seleccionados isolados de *E. coli* resistentes ao SxT, uma vez que este é muito utilizado em terapias empíricas na comunidade e começando a surgir uma percentagem significativa de microrganismos resistentes a este fármaco, este foi o grupo de antibiótico escolhido para aprofundar no presente trabalho.

Assim, constituíram objectivos deste estudo:

1. Avaliar, em ambulatório, a prevalência de *E. coli* em pacientes com infecções do tracto urinário (ITU);
2. Verificar o perfil de resistência dos isolados de *E. coli*, recolhidos dos pacientes com ITU, correlacionando com a presença dos respectivos determinantes genéticos;
3. Caracterizar filogeneticamente os isolados bacterianos seleccionados.

III. Material e Métodos

3.1. Isolados bacterianos

Entre Outubro e Dezembro de 2008 foram obtidos isolados bacterianos de exames bacteriológicos de urina positivos, destes isolados foram recolhidas estirpes de *E. coli* provenientes de doentes com infecção do tracto urinário. Tendo em conta os perfis de resistência obtidos durante o período de estudo em ambulatório – Laboratório Médico de Análises Clínicas Avelab, foram seleccionados isolados de *E. coli* para aprofundar no presente estudo.

O produto biológico escolhido para obtenção dos isolados foi a urina de pacientes com suspeita de infecções do tracto urinário. 25 isolados de *E. coli* resistentes ao Sulfametoxazol + Trimetoprim foram seleccionados para o presente estudo.

A conservação das estirpes foi feita em meio Levine, a 4°C.

3.2. Identificação dos isolados bacterianos

3.2.1. Coloração de Gram

É uma técnica de execução obrigatória em Bacteriologia como primeiro passo na identificação das espécies bacterianas, dado o comportamento característico destas espécies perante a técnica de Gram.

A constituição da parede celular das bactérias é a responsável pelo seu comportamento em relação à coloração (Figura 20). A coloração de Gram tem um grande significado taxonómico pois permite dividir as bactérias em 2 grupos: de Gram positivo e de Gram negativo. As bactérias de Gram positivo adquirem a cor arroxeada, conferida pelo primeiro corante (violeta de cristal) e as de Gram negativo coram de vermelho (fucsina básica/

Safranina). O diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram deve-se ao facto dos dois grupos bacterianos apresentarem parede celular química e estruturalmente diferente. As bactérias de Gram negativo apresentam a parede celular com elevado teor em lípidos e peptidioglicano pouco abundante e as de Gram positivo apresentam peptidioglicano muito abundante e baixo teor em lípidos.

Esta coloração permite também visualizar a morfologia das bactérias e classificá-las em cocos e bacilos de Gram positivo ou Negativo (Figura 21).

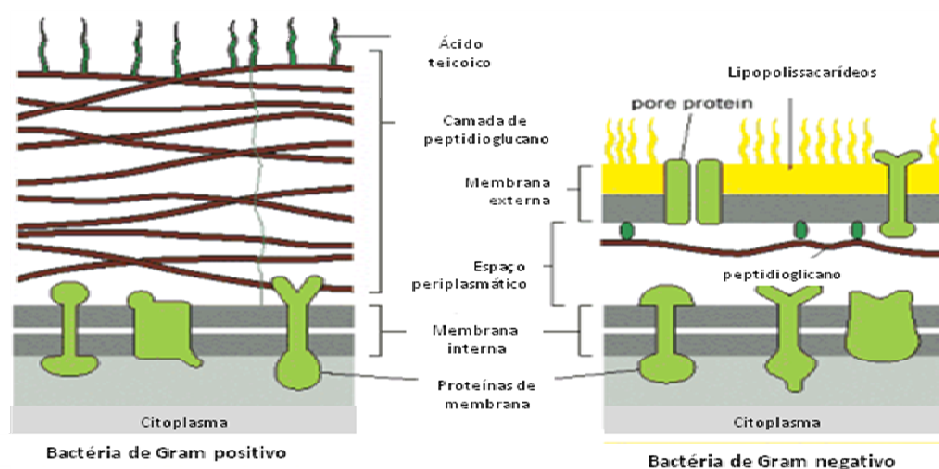


Figura 20: Representação esquemática das diferenças na parede celular de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, imagem adaptada de (ALBERTS, 2001).

3.2.1.1. Procedimento

1. Colocar sobre lâmina uma gota de suspensão microbiana e estender em esfregaço fino;
2. Secar e fixar pelo calor moderado;
3. Cobrir o esfregaço com Cristal Violeta e deixar repousar durante 1-2 minutos;
4. Escorrer o corante e lavar o esfregaço com água corrente;
5. Remover o excesso de água e cobrir com Soluto de Lugol. Deixar actuar 1-2 minutos;
6. Escorrer e lavar a preparação com álcool-acetona até que não arraste mais corante;
7. Lavar com água para parar a diferenciação;
8. Cobrir o esfregaço com solução de Safranina durante 2-3 minutos;
9. Lavar com água e deixar secar ao ar;
10. Observar ao microscópio;
 - a. As bactérias coradas de roxo dizem-se de Gram positivo;
 - b. As bactérias coradas de vermelho dizem-se de Gram negativo.

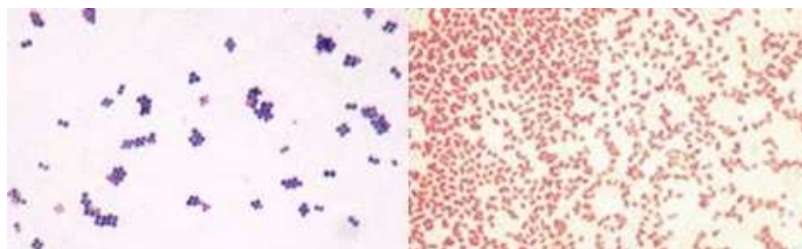


Figura 21: Coloração de Gram: Bactérias de Gram positivo (esquerda); Bactérias de Gram negativo (direita).

3.2.2. Cultura em meio Levine

É um meio de isolamento selectivo destinado à detecção de Enterobacteriaceae. A presença de dois corantes (eosina e azul de metileno) inibe o crescimento de bactérias de Gram positivo. Este meio permite diferenciar os microrganismos que fermentam a lactose e/ou sacarose dos que não fermentam.

As bactérias lactose e/ou sacarose positivas, originam colónias violeta escuro, por acidificação do meio, com eventual aparecimento de brilho metálico. As bactérias não fermentadoras dão origem a colónias incolores ou ligeiramente rosa (Figura 22) (BIOMÉRIEUX, 2003).

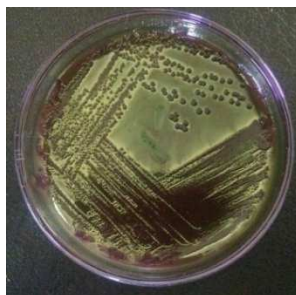


Figura 22: Fotografia de uma placa de meio Levine com colónias características de *E. coli*.

3.2.3. Identificação de *E. coli* pelo método Clássico

As colheitas de urina para o presente estudo foram todas obtidas a partir de jacto médio, por este motivo é considerada uma bacteriúria significativa quando o número de

colónias é igual ou superior a 100 (10×10^4 UFC). Só nestes casos se procedeu com a identificação do microrganismo responsável pela infecção.

Depois de realizada a coloração de Gram e de se isolarem colónias puras de bacilos em meio Levine, procede-se com a identificação de *E. coli* pelos métodos clássicos (Tabela 2, Figura 27).

A identificação pelo método clássico utiliza quatro meios que permitem evidenciar as características bioquímicas das Enterobacteriaceae.

(i) Meio de Kligler

Permite verificar a fermentação da glucose e lactose, assim como a produção de H_2S e gás. A fermentação dos açúcares é evidenciada pela acidificação do meio, que contém o indicador vermelho fenol, que passa de vermelho para amarelo. A produção de H_2S torna-se evidente pelo aparecimento da cor negra no meio e a produção de gás pela formação de bolhas de ar. A fermentação da glucose é observada no sedimento, enquanto a fermentação da lactose é observada na rampa. A produção de H_2S e gás pode ser observada em qualquer zona do meio de cultura (Figura 23) (BIOMÉRIEUX, 2003).

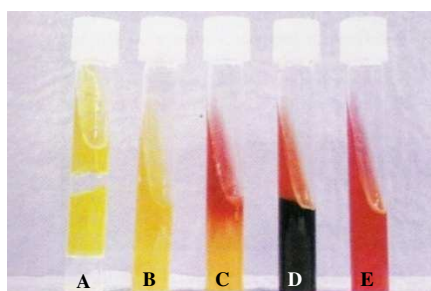


Figura 23: A: Tubo com um pico ácido (amarelo) e um fundo ácido (amarelo), que indica tanto fermentação da glucose como da lactose. Notar também o espaço vazio que existe no fundo do tubo e a ruptura do agar no centro deste, o que indica a produção de gás (CO_2) pelo microrganismo;

B: Tubo com uma reacção ácida/ácida mas sem presença de gás, típica de *E. coli*;

C: Tubo com um pico alcalino (vermelho) e o fundo ácido (amarelo), reacção típica de um microrganismo não fermentador da lactose;

D: Tubo com um pico vermelho (alcalino) e o fundo negro, o que indica produção de ácido sulfídrico (H_2S). Neste tipo de reacção presume-se que o fundo seja ácido (amarelo) indicando fermentação da glucose, mesmo que a cor amarela esteja mascarada pela produção de H_2S ;

E: Tubo vermelho/vermelho é uma reacção típica dos bacilos de Gram negativo que não fermentam a glucose nem a lactose (KONEMAN, 1997).

(ii) Meio Indol

O indol é um dos produtos de degradação do metabolismo do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase podem clivar o triptofano e, desse modo, produzir indol, ácido pirúvico e amônia. O indol pode ser detectado num meio que contenha triptofano, observando-se o aparecimento de uma cor vermelha após adição de uma solução com p -dimetilaminobenzaldeído (ex. Reagente de Kovacs) (Figura 24) (BIOMÉRIEUX, 2003).



Figura 24: A formação de indol a partir de triptofano é indicada pelo aparecimento de uma cor vermelha após adição do reagente de Kovacs (KONEMAN, 1997).

(iii) Meio Ureia

Permite detectar nas Enterobacteriaceae a presença da enzima urease. Esta enzima desdobra a ureia, alcalinizando o meio Ureia. Esta alcalinização provoca a viragem do indicador vermelho de fenol, de amarelo para vermelho (Figura 25) (BIOMÉRIEUX, 2003).



Figura 25: **A:** Mostra uma reacção fortemente positiva, cor vermelha/rosa em todo o tubo, indicando a reacção alcalina produzida pela degradação da ureia;
B: Mostra cor vermelha/rosa apenas no pico, indicando uma reacção fracamente positiva;
C: Controlo negativo, completamente amarelo (KONEMAN, 1997).

(iv) Meio de Citrato de Simmons

O princípio da prova de utilização de citrato é determinar a capacidade de um microrganismo utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono para o metabolismo e crescimento. Este meio é colocado num tubo de ensaio e é mantido inclinado até solidificação do meio. O inóculo do microrganismo em estudo é semeado na superfície inclinada do agar.

O aparecimento de cor azul no meio após 24h de incubação a 35°C indica a presença de produtos alcalinos e um resultado positivo para a utilização de citrato (Figura 26) (BIOMÉRIEUX, 2003).



Figura 26: O desenvolvimento no pico do agar de Citrato de Simmons e a viragem do indicador azul de bromotimol para uma cor azul alcalina indicam que o microrganismo pode utilizar o citrato de sódio como a única fonte de carbono (KONEMAN, 1997).

Tabela 2: Características bioquímicas de *E. coli* nos meios clássicos.

	Meio Kligler						
	Pico (Lactose)	Fundo (Glucose)	Gás	H ₂ S	Ureia	Indol	Citrato de Simmons
<i>Escherichia coli</i>	Ácido (amarelo)	Ácido (amarelo)	+	-	-	+	-



Figura 27: Identificação de *E. coli* pelo método clássico.

3.3. Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos

A determinação da sensibilidade de *E. coli* aos antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando a Técnica de Kirby – Bauer (KB) (Figura 28 e Tabela 3).

3.3.1. Procedimento

1. Meio de cultura
 - a. O meio de cultura a utilizar é agar Mueller-Hinton;
 - b. O pH do meio deve ser 7,2 a 7,4;
 - c. Nas placas o meio deve ter uma superfície plana e altura uniforme de 4mm;
 - d. As placas de Mueller-Hinton são conservadas no frigorífico (4°C).
2. Preparação do inóculo
 - a. A partir de uma cultura pura do microrganismo em estudo, escolher 4-5 colónias isoladas, morfológicamente semelhantes;
 - b. Tocar no centro de cada colónia e preparar uma suspensão com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland.
3. Inoculação das placas
 - a. Com uma zaragatoa previamente mergulhada na suspensão bacteriana, tendo o cuidado de a apertar e rolar contra as paredes do tubo para expelir o líquido em excesso, semear por estrias apertadas as placas de Mueller-Hinton em duas direcções ou mais, por toda a superfície do meio e passar no final a zaragatoa a toda a volta da placa;
 - b. Deixar secar o inóculo 3 a 5 minutos.
4. Aplicação dos discos de antibióticos
 - a. Os discos devem ser conservados no frigorífico em embalagens bem fechadas;
 - b. Devem atingir a temperatura ambiente antes de serem aplicados no meio;
 - c. Os discos são aplicados sobre a superfície do meio inoculado com um distribuidor mecânico ou com uma pinça, tendo o cuidado de exercer sobre cada um deles uma ligeira pressão para assegurar um perfeito contacto com o meio;
 - d. Os discos devem ser colocados a mais de 15mm do bordo da placa e distanciados uns dos outros de modo a evitar sobreposição das zonas de inibição.

5. Leitura dos resultados

- a. Após 24h de incubação, medir os diâmetros das zonas de inibição;
- b. As estirpes, de acordo com a inibição, são classificadas numa das seguintes categorias: Sensível, Intermédio e Resistente.

3.3.2. Perfil de antibióticos testados para *E. coli*

Tabela 3: Antibióticos testados para estirpes de *E. coli*. A azul estão os antibióticos para os quais as estirpes de *E. coli* apresentaram mais resistências.

PENICILINAS	Amoxicilina; Piperacilina; Pivmecilinam	
CEFALOSPORINAS	1ª Geração	Cefatrizina; Cefazolina
	2ª Geração	Cefoxitina; Cefuroxima
	3ª Geração	Cefodizina; Ceftadizina
	4ª Geração	Cefepima
MONOBACTAMICOS	Aztreonamo	
CARBAPENEMOS	Imipenemo	
AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÂNICO	Amoxicilina + Ácido clavulânico	
AMINOGLICOSÍDEOS	Amicacina; Gentamicina; Isepamicina; Netilmicina; Tobramicina	
QUINOLONAS	Norfloxacin; Ofloxacin; Ciprofloxacina; Lomefloxacina	
SULFAMATOZAXOL + TRIMETOPRIM	Sulfamatozaxol + Trimetoprim	
NITROFURONAS	Nitrofurantoína	

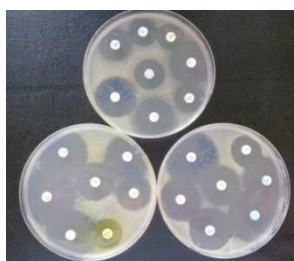


Figura 28: Fotografia de uma placa de antibiograma para *E. coli* com os antibióticos em cima referidos e respectivos halos de inibição.

3.4. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

De uma cultura em meio Levine com um período de incubação a 37 °C de 18-24H, retiraram-se duas colônias, que se suspenderam em 200µL de água destilada estéril. Desta suspensão foi retirado 1µl para a reacção de PCR (Tabela 4). Todas as reacções de PCR foram preparadas para um volume final de 50µL e decorreram num termociclador modelo Thermo Hybaid® PxE. 0,2.

Tabela 4: Indicação da concentração final dos componentes da reacção de PCR.

Reagentes	Concentração final	Volume
25 mM MgCl ₂	3,0 mM	6,0
5 x Tampão ⁽¹⁾	1 x	2,5
2 mM dNTP mix	0,2 mM de cada	5,0
DMSO ⁽²⁾	5 %	2,5
Iniciador 1	0,3 pmol/µl	1,5
Iniciador 2	0,3 pmol/µl	1,5
DNA total	Variável	variável
<i>Taq</i> (1 U µL ⁻¹)	1 U	1,0
dH ₂ O	-	até perfazer V = 50,0 µL

⁽¹⁾ Possui sulfato de amónia (NH₄)₂SO₄

⁽²⁾ Foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) para uma melhor desnaturação do DNA

3.4.1. Pesquisa de integrões

Para a pesquisa de integrões de classe 1 utilizaram-se os iniciadores descritos na tabela 5 e as condições de amplificação referidas na tabela 6.

Tabela 5: Sequência dos iniciadores para pesquisa do gene codificante da integrase de classe 1, das zonas variáveis, tamanho dos respectivos fragmentos e referência bibliográfica.

Designação do iniciador	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência
HS 463a	5'-CTGGATTTTCGATCACGGCACG-3'	<i>int 1</i>	500 bp	(BARLOW, 2004)
HS 464	5'-ACATGCGTGTAATCATCGTCG-3'			
RB 317	5'-GAACCTTGACCGAACGCAG-3'	-	Variável	(BARLOW, 2004)
RB 320	5'-AGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG-3'			

Tabela 6: Condições utilizadas nas reacções de amplificação de integrase de classe 1 e respectivas zonas variáveis.

Fases do PCR	Programa			
	integrase (<i>int1</i>)		zona variável	
Desnaturação inicial	94°C	4'	94°C	4'
Desnaturação	94°C	30''	94°C	30''
Hibridação dos iniciadores	65°C	30''	59°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	45''	72°C	3' 30''
Ciclos	30 vezes		30 vezes	
Síntese final	72°C	5'	72°C	10'
Após final da reacção	15°C	∞	15°C	∞

3.4.2. Pesquisa dos genes *sul1*, *sul2* e *sul3*

Para a pesquisa dos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* utilizaram-se os iniciadores descritos na tabela 7 e as condições de amplificação referidas na tabela 8.

Tabela 7: Sequência dos iniciadores para pesquisa dos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* e respectiva referência bibliográfica.

Designação do iniciador	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência
<i>sul1</i> F	5'-CGGCGTGGGCTACCTGAACG-3'	<i>sul1</i>	245 pb	(HOA, 2008)
<i>sul1</i> R	5'-GCCGATCGCGTGAAGTTCCG-3'			
<i>sul2</i> F	5'-GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3'	<i>sul2</i>	750 pb	
<i>sul2</i> R	5'-GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3'			
pVP440 <i>sul3</i> F	5'-TCAAAGCAAAATGATATGAGC-3'	<i>sul3</i>	238 pb	
pVP440 <i>sul3</i> R	5'-TTTCAAGGCATCTGATAAAGAC-3'			

Tabela 8: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos genes *sul1*, *sul2* e *sul3*.

Fases do PCR	Programa					
	<i>sul1</i>		<i>sul2</i>		<i>sul3</i>	
Desnaturação inicial	94°C	4'	94°C	4'	94°C	3'
Desnaturação	94°C	30''	94°C	30''	94°C	30''
Hibridação dos iniciadores	55°C	30''	55°C	30''	50°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	45''	72°C	45''	75°C	1'
Ciclos	30 vezes		30 vezes		30 vezes	
Síntese final	72°C	5'	72°C	5'	72°C	5'
Após final da reacção	15°C	∞	15°C	∞	15°C	∞

3.5. Estudo da variabilidade genética

Para a genotipagem dos isolados em estudo, utilizou-se a técnica rep-PCR, estando os iniciadores e condições de reacção de PCR descritos nas tabelas 10 e 11.

Tabela 9: Sequência dos iniciadores para amplificação por ERIC-PCR e respectiva referência bibliográfica.

Designação do iniciador	Sequência do iniciador	Referência
ERIC 1	5'-CAGCCATGAACAACACTGGTGGCG-3'	(VERSALOVIC, 1991)
ERIC 2	5'-TGCTTTGCGCAGGGAAGATTCC-3'	

Tabela 10: Condições utilizadas nas reacções de amplificação por ERIC-PCR.

Fases do ERIC- PCR	Programa	
Desnaturação inicial	95°C	7'
Desnaturação	94°C	1'
Hibridação dos iniciadores	52°C	1'
Síntese das cadeias	65°C	8'
Ciclos	35 vezes	
Síntese final	65°C	16'
Após o final da reacção	15°C	∞

3.6. Purificação e Sequenciação de produtos de PCR

Os produtos de amplificação resultantes do ponto 4 foram purificados, utilizando o kit “QAgquick Gel Extraction” (Qiagen) conforme as instruções do fornecedor e posteriormente sequenciados. O electroforetograma resultante da sequenciação foi analisado com o programa Biont 7.0.9.

As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas na base de dados “Genbank”.

Tabela 11: Procedimento para a purificação de produtos de PCR.

- | |
|---|
| 1. Adicionar 3 volumes de tampão QG a um volume de gel de agarose (100mg ~100µl); |
| 2. Incubar a 50°C durante 3 minutos; |
| 3. Colocar uma coluna no tubo colector de 2mL; |
| 4. Transferir a amostra para a coluna e centrifugar a 13000r.p.m. durante 1 minuto; |
| 5. Remover o líquido recolhido no tubo. Colocar novamente a coluna no tubo de 2mL; |
| 6. Adicionar 500µl de tampão QG à coluna. Centrifugar a 13000r.p.m. durante 1 minuto; |
| 7. Remover o líquido recolhido no tubo. Colocar novamente a coluna no tubo de 2mL; |
| 8. Adicionar 750µl de tampão PE e centrifugar a 13000r.p.m. durante 1 minuto; |
| 9. Centrifugar novamente nas mesmas condições para remover o restante da solução PE; |
| 10. Descartar o tubo colector e colocar a coluna num microtubo de 1,5mL; |
| 11. Adicionar 50µl de água destilada directamente no centro da coluna; |
| 12. Centrifugar a 13000r.p.m. durante 1 minuto; |

3.7. Electroforese em gel de agarose e visualização do DNA

Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (Amersham, Uppsala, Suécia), com uma concentração de 1%, em tampão (TAE) 1x, ao qual se adicionou brometo de etídio a uma concentração final de 10mg/ml.

O volume de amostra aplicado no gel foi 1/10 do volume de reacção, ao qual se adicionou tampão de carga 1x concentrado (Tabela 9).

A electroforese decorreu a 80V, durante 1 hora e 30 minutos, em tampão TAE 1x (Tabela 9).

Em todas as electroforeses efectuadas, foram introduzidos marcadores de peso molecular de DNA conhecido. O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por comparação com a migração dos fragmentos de peso molecular conhecido (Southern, 1975). No presente trabalho utilizou-se o marcador GeneRuler™ 100 pb plus (Fermentas).

O DNA foi visualizado num transiluminador de luz UV e a sua imagem adquirida no sistema “ATTA, Biosinstruments”.

Tabela 12: Constituição do tampão de carga e do TAE.

Tampão de carga (6x)	0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % xileno cianol; 40 % sacarose ou 30 % glicerol (pH 8,0).
TAE (1x)	40 mM Tris-base; 20 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA (pH 8,3)

IV. Resultados e Discussão

4.1. Dados epidemiológicos

Os dados apresentados referem-se a um estudo efectuado entre Outubro e Dezembro de 2008 no ambulatório – Laboratório Médico de Análises Clínicas Avelab. As amostras enviadas para este laboratório são oriundas do distrito de Aveiro.

O produto biológico escolhido foi a urina de pacientes com suspeita de infecção urinária. Podem ser efectuados dois tipos de análise à urina: (i) análise sumária de urina, em que se obtêm apenas as características físico-químicas da urina, como o pH e a densidade; (ii) exame bacteriológico de urina. Os isolados foram obtidos de amostras de urina com o exame bacteriológico positivo para *E. coli*.

Como o estudo foi realizado de Outubro a Dezembro de 2008 serão analisados os resultados obtidos em cada mês.

No mês de **Outubro** foram analisadas 12662 amostras de urina. Em 82% das urinas foi realizada apenas a análise sumária de urina, uma análise meramente de rotina cuja finalidade é verificar as características físico-químicas da urina e em 18% foi realizado o exame bacteriológico de urina (Figura 29).

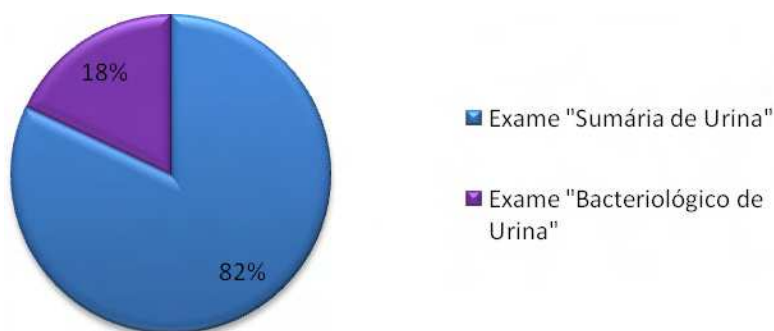


Figura 29: Exames à urina num universo de 12662 amostras.

Do exame bacteriológico de urina, 84% das amostras foram negativas e 16% tiveram um resultado positivo (Figura 30).



Figura 30: Percentagem do exame bacteriológico positivo e negativo de urina em 2282 exames realizados.

Tendo em conta os resultados obtidos nos exames bacteriológicos de urina positivos, verifica-se que o microrganismo mais frequentemente responsável por infecção urinária é a *E. coli*, com uma percentagem de 55,2% nos casos de infecção urinária (Figura 31).

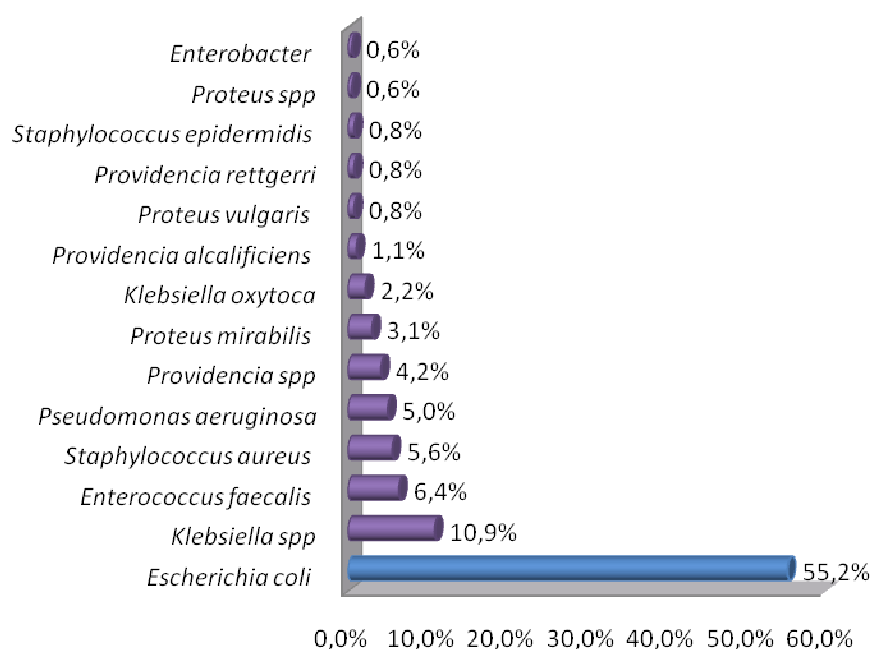


Figura 31: Microrganismos isolados nos exames bacteriológicos positivos em Outubro de 2008.

No mês de **Novembro** foram analisadas 10657 amostras de urina. Em 82% das amostras foi realizada apenas a análise sumária de urina e em 18% o exame bacteriológico de urina (Figura 32).

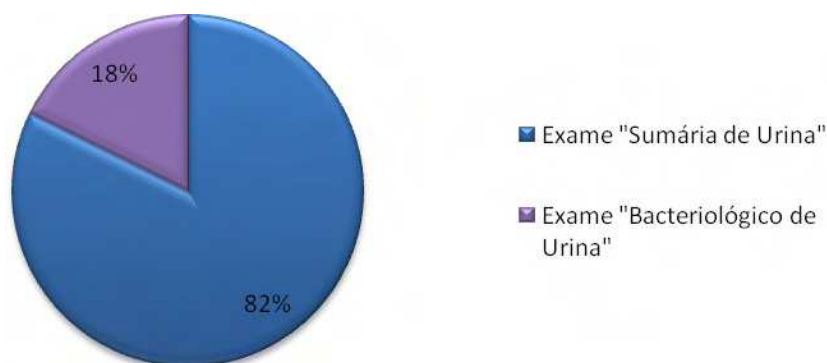


Figura 32: Exames à urina num universo de 10657 urinas.

Tendo em conta apenas o exame bacteriológico de urina, 82% das amostras foram negativas e 18% tiveram um resultado positivo (Figura 33).

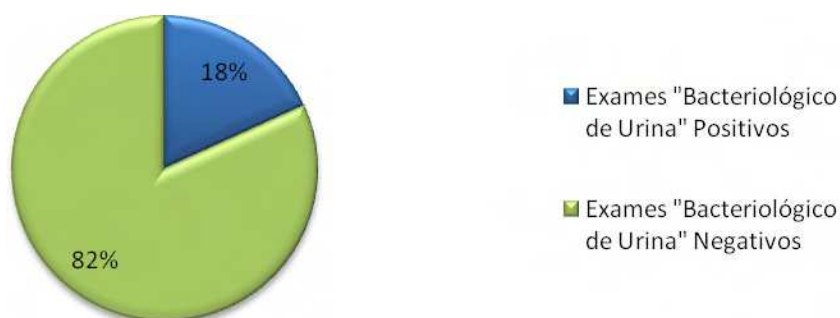


Figura 33: Percentagem do exame bacteriológico positivo e negativo de urina em 1885 exames realizados.

Analisando os resultados obtidos nos exames bacteriológicos de urina positivos, verifica-se novamente que o microrganismo mais frequentemente responsável por infecção urinária é *E. coli*, com uma percentagem de 52,5% nos casos de infecção urinária (Figura 34).

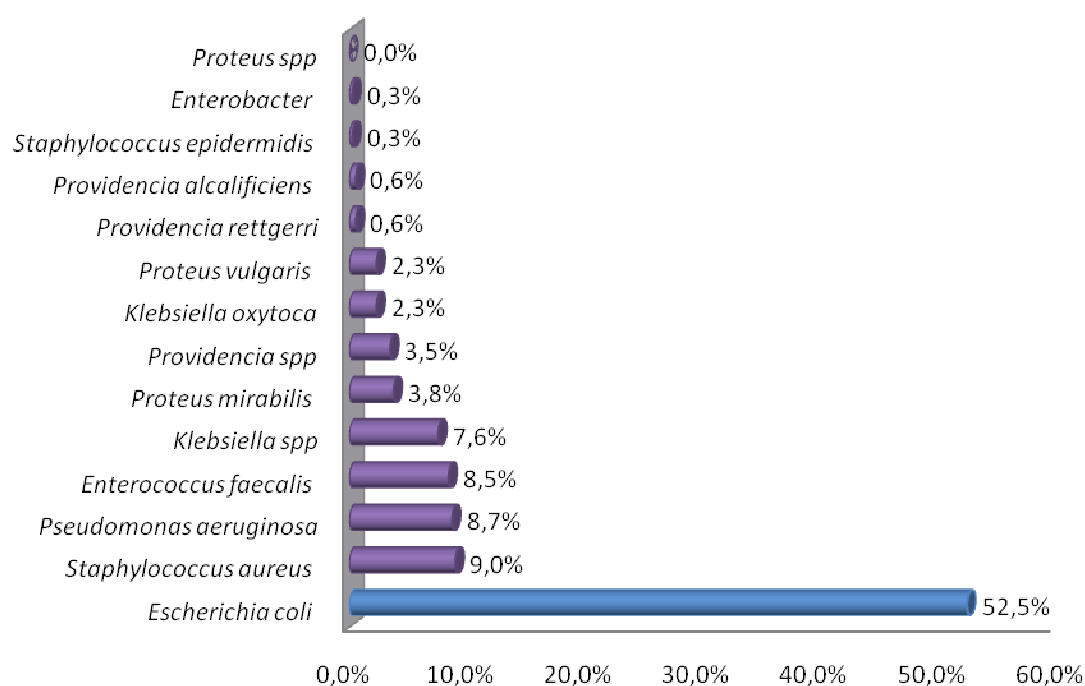


Figura 34: Microrganismos isolados nos exames bacteriológicos positivos em Novembro de 2008.

No mês de **Dezembro** foram analisadas 8430 amostras de urina. Em 80% das amostras foi realizada apenas a análise sumária de urina e em 20% o exame bacteriológico de urina (Figura 35).

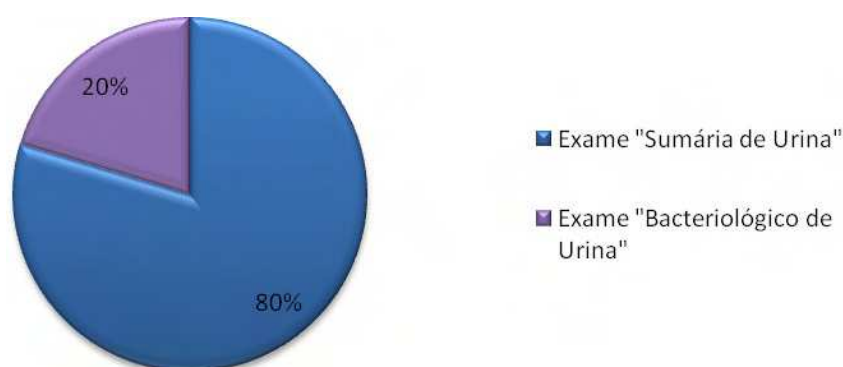


Figura 35: Exames à urina num universo de 8430 amostras de urina.

Tendo em conta apenas o exame bacteriológico de urina, 81% das amostras foram negativas e 19% tiveram um resultado positivo (Figura 36).

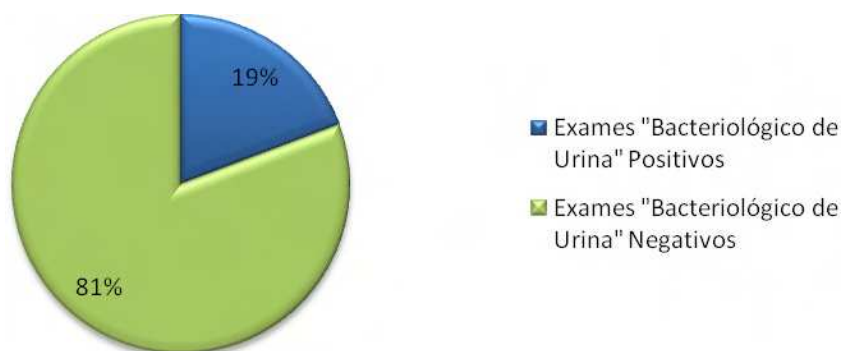


Figura 36: Percentagem do exame bacteriológico positivo e negativo de urina em 1718 exames realizados.

Uma análise dos resultados obtidos nos exames bacteriológicos de urina positivos, mais uma vez se verifica que o microrganismo mais frequentemente responsável por infecção urinária é a *E. coli*, com uma percentagem de 51,4% nos casos de infecção urinária (Figura 37).

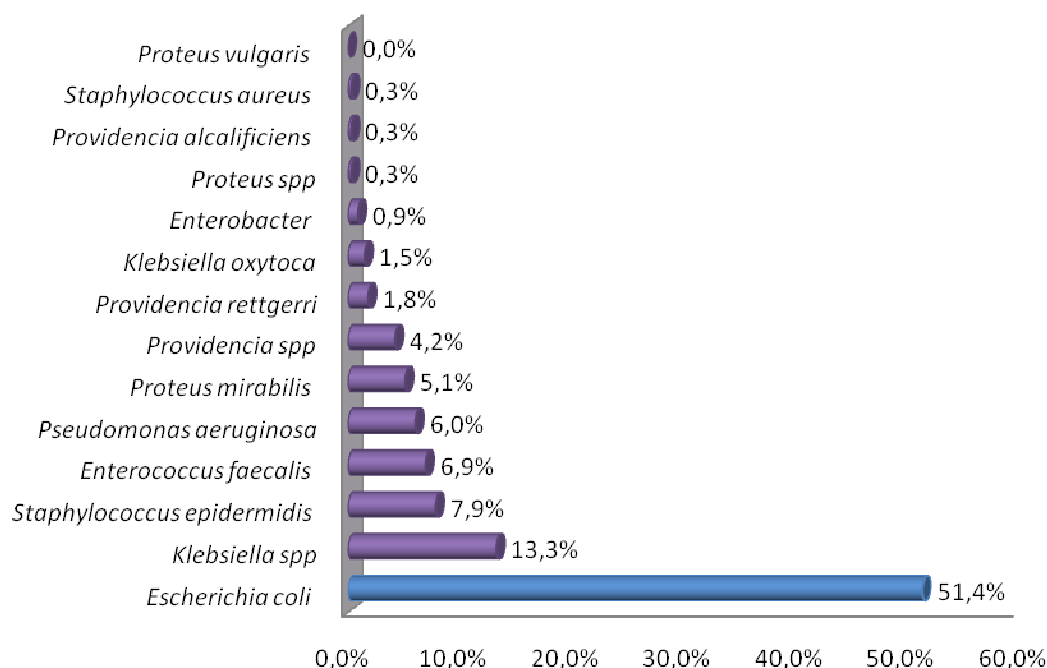


Figura 37: Microrganismos isolados nos exames bacteriológicos positivos em Dezembro de 2008.

Como já descrito por vários autores, as infecções do trato urinário em humanos são as infecções bacterianas mais comuns, afectando tanto doentes a nível hospitalar como pessoas da comunidade em geral (PIATTI, 2008).

Karlowsky, et al., refere que *E. coli* é o principal microrganismo responsável pela maioria das infecções urinárias e cerca de 75% a 90% dos casos de infecções urinárias são causadas por esse microrganismo (JAMES A.; KARLOWSKY, 2002) (SOTO, 2006). Os dados obtidos ao longo dos três meses de estudo em ambulatório, no distrito de Aveiro, referem precisamente que *E. coli* é o principal microrganismo responsável por infecções urinárias, estando presente em 50 a 55% dos casos de infecções urinárias. Estas infecções têm uma elevada percentagem de incidência a nível da comunidade. Cerca de 80% dos doentes que realizam análises fazem o exame à urina e aproximadamente 20% apresentam infecção urinária. O exame bacteriológico negativo apresenta uma percentagem elevada ao longo dos três meses de estudo, possivelmente devido ao elevado número de uroculturas ser apenas de rastreio, tanto em grávidas como em pacientes que realizam um controlo pós-tratamento. Podem existir ainda síndromes uretrais que podem apresentar sintomas semelhantes ao de infecção urinária mas com uma origem não bacteriana (CORREIA, 2007).

4.1.1. Isolados bacterianos

Durante os três meses de estudo, foram obtidos 1031 isolados de pacientes com exame bacteriológico positivo. A média de idades desses doentes está compreendida entre 55 e 62 anos de idade. Os pacientes do sexo masculino têm uma média de idades compreendida entre 60 e 62 anos de idade e os pacientes do sexo feminino entre 55 e 58 anos de idade (Figura 38).

As mulheres jovens são especialmente propensas a infecções urinárias devido à actividade sexual, no entanto o segundo maior grupo etário com infecções urinárias são pacientes com idades superiores a 65 anos (LOUREIRO, 2006). Nesta faixa etária as pessoas apresentam grandes dificuldades em realizar correctamente a sua higiene diária e algumas delas necessitam de usar fralda ou algália, o que aumenta a probabilidade de

infecção urinária. Os dados obtidos neste estudo ilustram um predomínio de infecções urinárias na população idosa.

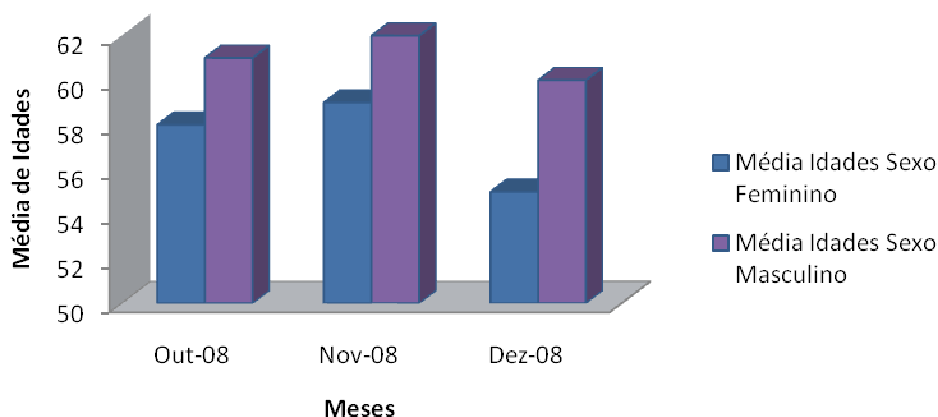


Figura 38: Média de idades dos doentes do sexo feminino e masculino que obtiveram um exame bacteriológico de urina positivo.

A percentagem de pacientes do sexo feminino com exame bacteriológico de urina positivo foi entre 67,4% e 75,4% e a percentagem de pacientes do sexo masculino foi entre 24,6% e 32,6% (Figura 39).



Figura 39: Percentagem dos doentes de sexo feminino e dos doentes de sexo masculino com exame bacteriológico de urina positivo.

As infecções do tracto urinário são frequentes na população, com maior frequência nas mulheres, devido ao facto da uretra feminina ser mais curta, favorecendo a colonização pela flora fecal. Outro factor importante na mulher é a probabilidade de contaminação bacteriana da uretra feminina durante o acto sexual (BLATT, 2005).

Os dados obtidos neste estudo sugerem que as infecções urinárias são mais comuns nas mulheres, uma vez que 67,4% a 75,4% das infecções urinárias foram em doentes do sexo feminino. Este facto já foi referido anteriormente por outros autores, como por exemplo *Kalpana Gupta, et al.*, que afirma que as infecções urinárias adquiridas na comunidade são mais comuns nas mulheres (KALPANA, 2001).

O presente estudo partiu dos 1031 isolados bacterianos de exames bacteriológicos de urina positivos. Destes isolados 547 foram de *E. coli* (53% dos isolados) onde foi posteriormente realizado o antibiograma e tendo em conta o perfil de resistências dos isolados aos antimicrobianos, foram seleccionados 25 isolados de *E. coli* para aprofundar no presente estudo.

4.1.2. Resistências aos antimicrobianos testados

4.1.2.1. Resistências de isolados de *E. coli* a antibióticos da classe das Penicilinas

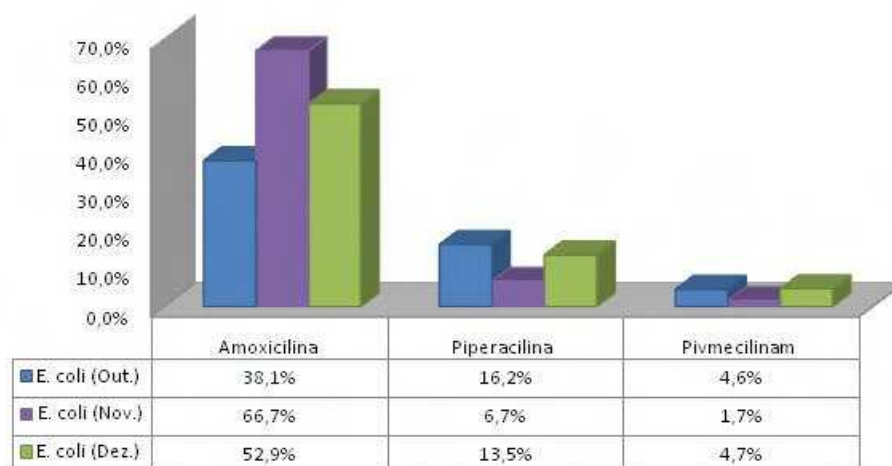


Figura 40: Gráfico representativo das resistências de *E. coli* a penicilinas nos três meses de estudo.

O antibiograma realizado nas estirpes de *E. coli* responsáveis por infecções urinárias testa uma vasta gama de antibióticos. O grupo de antibióticos onde a percentagem de resistências é mais elevada é o das penicilinas, com valores até 66,7% de resistências para a amoxicilina (Figura 40).

Comparando os dados obtidos durante os três meses de estudo em doentes de ambulatório no distrito de Aveiro com um estudo realizado de Abril de 2004 a Março de 2006 na Unidade Hospitalar de Bragança, os resultados obtidos para a susceptibilidade das estirpes de *E. coli* à amoxicilina foram bastante baixos em ambos os casos. Em ambos os distritos a percentagem de resistência foi superior a 50% (66,7% em Aveiro e 53,6% em Bragança) (CORREIA, 2007). A baixa percentagem de acção das penicilinas em estirpes de *E. coli* pode relacionar-se com a presença de enzimas β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico, conferindo resistência a todos os antibióticos do grupo das penicilinas. A administração destes antibióticos só se torna eficaz quando combinada com um inibidor destas enzimas, como por exemplo o ácido clavulânico.

4.1.2.2. Resistências de isolados de *E. coli* a antibióticos da classe das Cefalosporinas

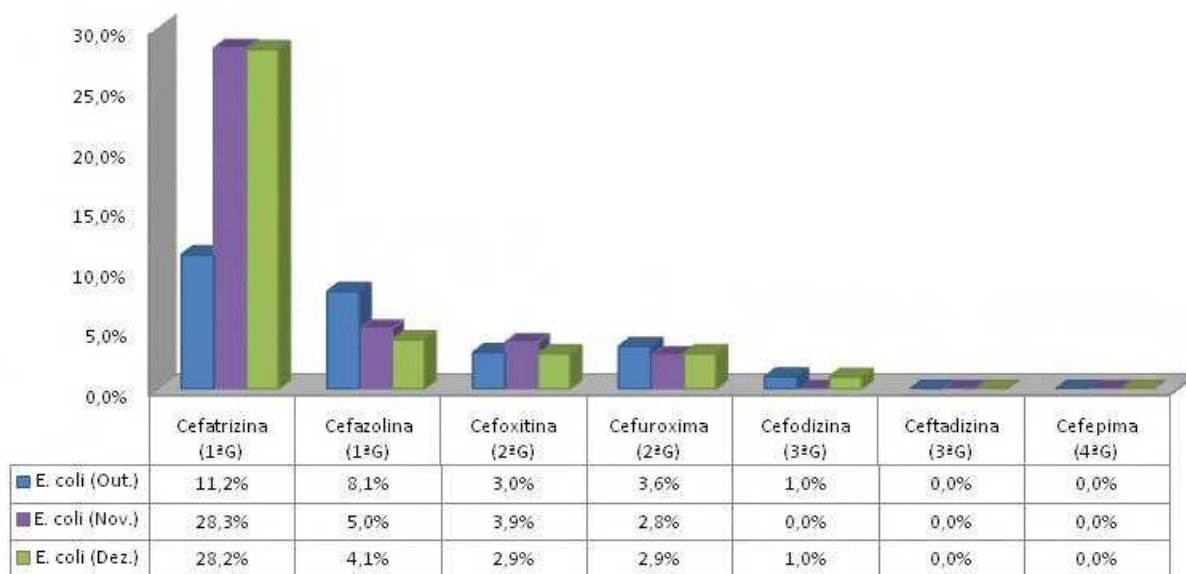


Figura 41: Gráfico representativo das resistências de *E.coli* a cefalosporinas nos três meses de estudo.

No grupo das cefalosporinas foram testadas cefalosporinas de 1ªGeração (cefatrizina, cefazolina), 2ªGeração (cefoxitina, cefuroxima), 3ªGeração (cefodizina, ceftadizina) e de 4ªGeração (cefepima). Tal como se pode verificar na figura 41 a maior percentagem de resistências foi nas cefalosporinas de 3ªGeração, nomeadamente cefatrizina (11,2 a 28,2%).

A percentagem de resistências a este grupo de antibióticos pode ser justificada com o que foi referido anteriormente para as penicilinas. Tendo em conta as três gerações de cefalosporinas o facto de existir uma maior percentagem de resistências nas cefalosporinas de 1ªGeração pode estar relacionado com o facto deste grupo de cefalosporinas ser menos resistente à hidrólise pelas β -lactamases. As cefalosporinas de 3ªGeração apresentam o espectro de acção mais alargado em relação às bactérias de Gram Negativo porque são mais resistentes à hidrólise pelas β -lactamases. Esta característica pode ser responsável pelo facto da resistência a este grupo ainda ser menor, comparativamente com os restantes (INFARMED).

Outras cefalosporinas, de aparecimento posterior, comumente designadas de 4ª geração, não demonstraram qualquer vantagem em relação às necessidades hospitalares.

Possivelmente serão menos prescritas em casos de ITU por bacilos de Gram Negativo e ainda não existem percentagens de resistência significativas.

4.1.2.3. Resistências de isolados de *E. coli* a antibióticos do grupo dos Monobactâmicos, Carbapenemos e Amoxicilina + Ácido Clavulânico.

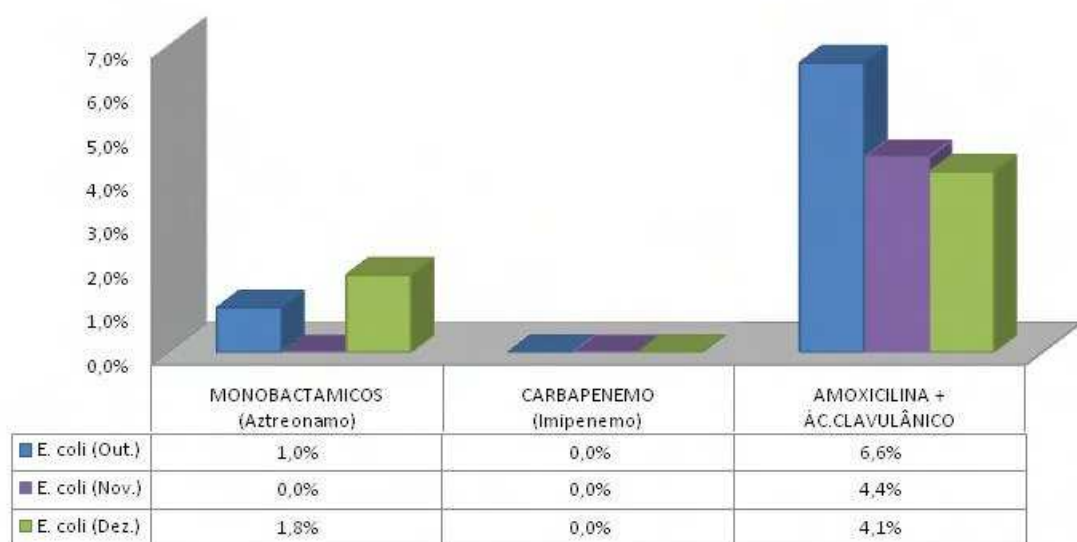


Figura 42: Gráfico representativo das resistências de *E. coli* a monobactâmicos, carbapenemos e amoxicilina + ácido clavulânico nos três meses de estudo.

No grupo dos monobactâmicos a resistência foi reduzida (1 a 1,8%) e os carbapenemos foram o único grupo de antibióticos para o qual as estirpes estudadas foram todas sensíveis. Para amoxicilina + ácido clavulânico as percentagens foram entre 4,1 e 6,6% (Figura 42), o que comprova o referido anteriormente em relação à produção de β -lactamases pelas estirpes de *E. coli*. O antibiótico amoxicilina administrado isoladamente teve percentagens de resistência de 66,7%, enquanto administrado em associação com o ácido clavulânico as percentagens de resistência baixaram para cerca de 5%.

Os monobactâmicos e os carbapenemos serão possivelmente menos prescritos no tratamento de ITU causadas por bacilos de Gram negativo. As estirpes de *E. coli*, apresentam por isso, percentagens mais baixas e até mesmo nulas de resistência a estes antibióticos.

4.1.2.4. Resistências de isolados de *E. coli* a antibióticos do grupo dos Aminoglicosídeos

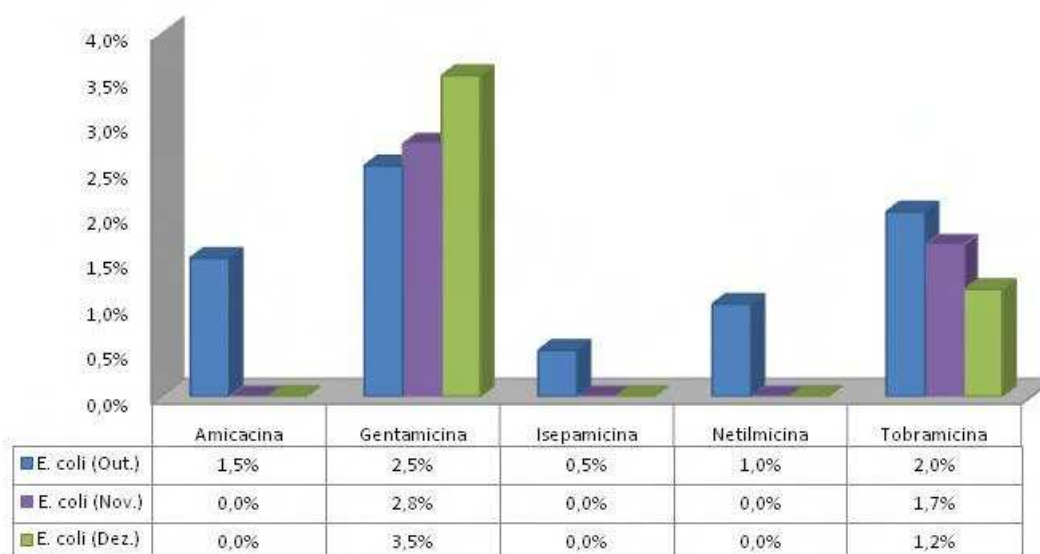


Figura 43: Gráfico representativo das resistências de *E. coli* a aminoglicosídeos nos três meses de estudo.

Os aminoglicosídeos, representados na figura 43, foram outro grupo de antibióticos testado, onde a gentamicina foi o antibiótico que apresentou percentagens de resistência mais elevadas (2,5 a 3,5%).

Este grupo de antibióticos tal como se verificou na zona de Bragança foi o grupo de antibióticos com percentagens de resistência mais baixas. Tal como já referido no estudo realizado na população de Bragança este grupo de antibióticos pode ser utilizado em tratamentos empíricos de ITU porque nestas situações deve-se administrar ao doente antibióticos em que a percentagem de sensibilidade é, no mínimo 80 a 90%, o que é verificado no presente estudo no distrito de Aveiro (CORREIA, 2007).

4.1.2.5. Resistências de isolados de *E. coli* a antibióticos do grupo das Quinolonas

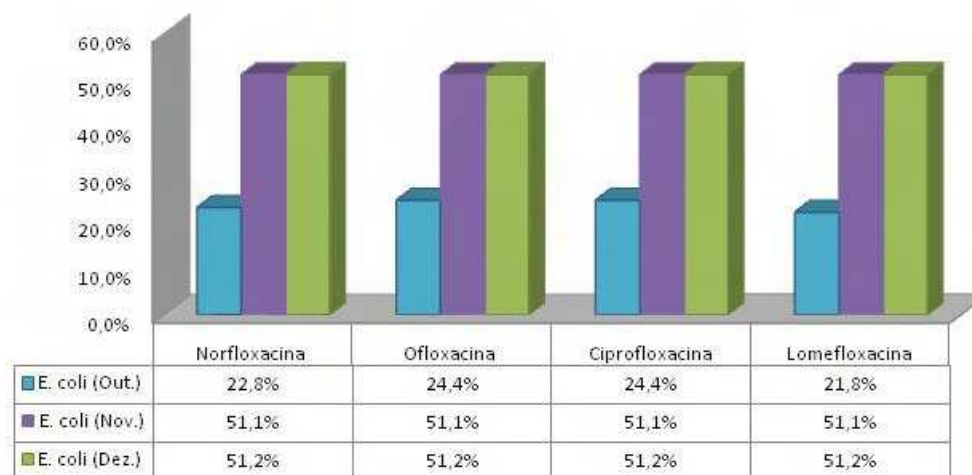


Figura 44: Gráfico representativo das resistências de *E. coli* a quinolonas nos três meses de estudo.

Tendo em conta a figura 44 as quinolonas são o segundo grupo de antibióticos para o qual as estirpes de *E. coli* apresentam mais resistências. Os antibióticos testados neste grupo foram a norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin e lomefloxacin e todos apresentam percentagens de resistência muito semelhantes (21,8 e 51,2%).

Estes resultados podem dever-se ao seu elevado consumo desde a sua introdução no mercado. Os valores neste estudo estão concordantes com os dados obtidos num estudo realizado pelo Infarmed onde se verifica que no primeiro semestre de 2008 o grupo de antibióticos quinolonas é o segundo mais utilizado em Portugal, estando deste modo o elevado consumo relacionado com o aumento da resistência das estirpes de *E. coli* ao antibiótico (INFARMED).

4.1.2.6. Resistências de isolados de *E. coli* a antibióticos do grupo do Sulfametoxazol + Trimetoprim

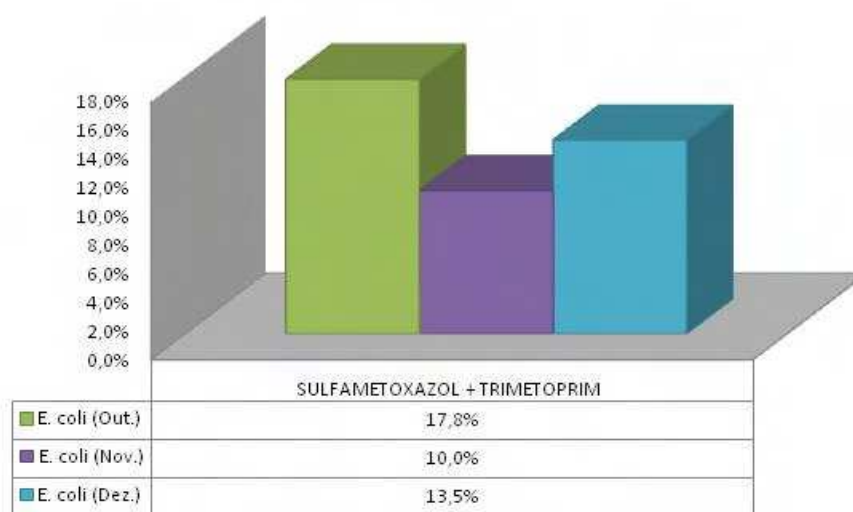


Figura 45: Gráfico representativo das resistências de *E. coli* a sulfametoxazol + trimetoprim nos três meses de estudo.

Por último, no grupo de antibióticos Sulfametoxazol + Trimetoprim (SxT) observaram-se percentagens de resistência entre 10 e 17,8%, como verificado na figura 45 e 46. O estudo realizado na população de Bragança não abordou este grupo de antibióticos, sendo apenas possível comparar as percentagens obtidas com estudos realizados nos Estados Unidos. Este grupo de antibióticos é frequentemente utilizado em casos de infecções urinárias e, tal como refere *Karlowsky, et al.*, é o antibiótico mais prescrito em tratamentos antimicrobianos empíricos, mesmo quando a sua prevalência de resistência é de 10 a 20% nos Estados Unidos (JAMES A. KARLOWSKY, 2002, JAMES A.; KARLOWSKY, 2002). Comparando as percentagens de resistências em Portugal durante três meses com as percentagens obtidas nos Estados Unidos para o SxT pode-se concluir que o número de resistências é muito semelhante e que o comportamento das estirpes é semelhante face aos antibióticos, independentemente do país.

4.1.2.7. Total de antibióticos com maior perfil de resistências em isolados de *E. coli*

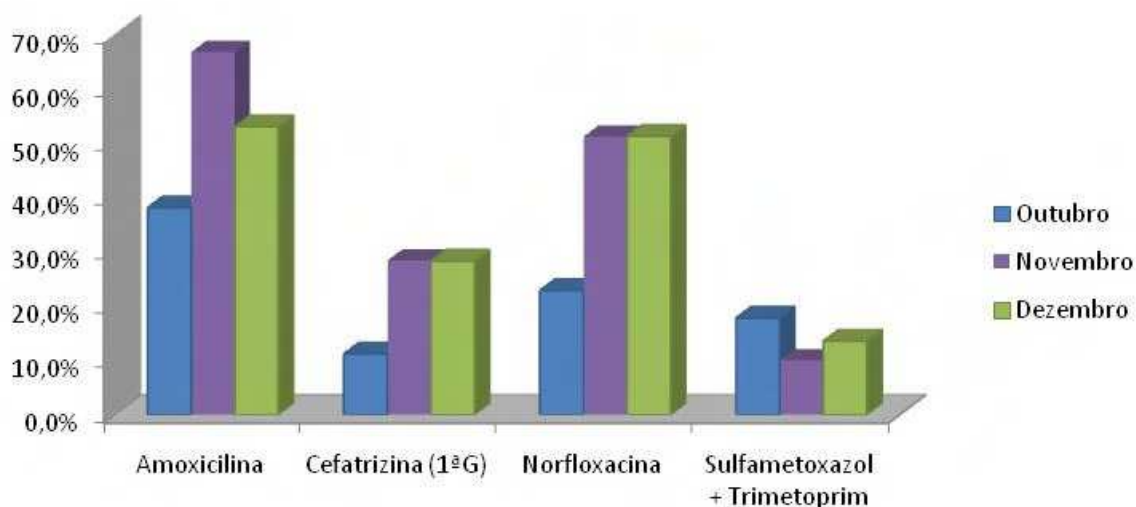


Figura 46: Gráfico representativo dos antibióticos que apresentaram mais resistências em *E. coli* durante os três meses de estudo.

O gráfico representado na figura 46 resume os quatro grupos de antibióticos onde se verificou uma percentagem de resistência mais elevada. Resumidamente, o grupo das penicilinas e das cefalosporinas apresenta percentagens de resistência elevadas devido à presença das enzimas β lactamases. O grupo das quinolonas devido ao facto de ser muito prescrito na prática clínica e o grupo do sulfametoxazol + trimetoprim por ser um antibiótico muito prescrito em caso de tratamentos empíricos para ITU.

O grupo de antimicrobianos de eleição para aprofundar no presente trabalho foi o sulfametoxazol + trimetoprim, não por ser o grupo com maior percentagem de resistências mas por ser um grupo de antibióticos muito prescrito na clínica em caso de infecções urinárias e também muito utilizado na veterinária, o que propicia uma percentagem de resistências significativas a nível da comunidade, como as verificadas neste estudo. Deste modo, tendo em conta os 547 isolados de *E. coli*, 76 isolados foram resistentes ao SxT, sendo 25 a média de isolados resistentes ao SxT em cada mês de estudo. Foram assim seleccionados, aleatoriamente, 25 isolados de *E. coli* resistentes ao SxT ao longo dos três meses de estudo.

O Trimetoprim (TMP) e Sulfonamidas (SULs) são agentes antimicrobianos sintéticos. Em 1932 surgiu a primeira SUL e em 1962 foi introduzido o TMP na clínica.

Desde 1968, o TMP começou a ser utilizado em combinação com as SULs, porque os dois compostos juntos possuem um grande sinergismo *in vitro* (HUOVINEN, 1995).

TMP e SULs possuem um elevado espectro antibacteriano, incluindo os microrganismos responsáveis pelas infecções urinárias (*E. coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae), microrganismos responsáveis por infecções do trato respiratório (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*), entre outros. Dado o seu espectro de acção e o seu baixo custo a combinação de TMP+SUL foi muito utilizada em todo o mundo, incluindo nos países menos desenvolvidos (HUOVINEN, 1995).

Ao longo das três décadas anteriores, a combinação do sulfametoxazol + trimetoprim ocupou o papel central no tratamento de várias infecções, tanto nas mais comuns, como por exemplo em infecções urinárias como nas infecções mais específicas e graves. No entanto, o aparecimento de resistências levou a uma mudança de comportamento perante o uso deste antibiótico na prática clínica e apesar de existir uma diminuição no uso de SxT no tratamento empírico de infecções, este continua a ser uma alternativa altamente considerada no tratamento de várias infecções (MASTERS, 2003).

Devido ao facto das SULs e do TMP serem utilizados durante muitas décadas como um antimicrobiano eficiente e de baixo custo, a resistência a ambos os compostos expandiu-se rapidamente. A figura 46 ilustra a percentagem significativa de resistências verificada neste grupo de antibiótico

4.2. Pesquisa de integrões

Todos os resultados obtidos tiveram como base a organização estrutural de um integrão de classe 1, o mais frequente em bactérias de Gram Negativo.

Um integrão de classe 1 é constituído por uma região variável flanqueada pelas regiões conservadas 5' (5'CS) e a 3' (3'CS). A região 5' apresenta o gene *int*, o local de recombinação *attI* e o promotor. A região 3' é formada pelos genes *qacEΔ1*, que codifica a resistência a compostos de amónio quaternário e brometo de etídio e *sulI* que codifica a

resistência a sulfonamidas. Entre os extremos 5'CS e 3'CS encontra-se uma zona variável na qual podem estar presentes ou ausentes cassetes de genes de resistência a antibióticos.

4.2.1. Pesquisa do gene da integrase de classe 1

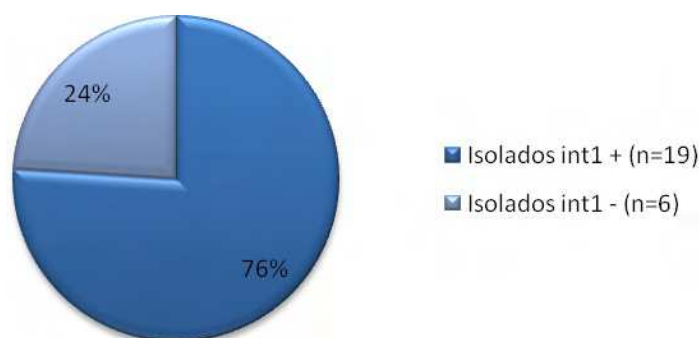


Figura 47: Resultados da pesquisa do gene *int1* em 25 isolados de *E. coli*.

A pesquisa do gene da integrase de classe 1 (*int1*) foi efectuada nos 25 isolados seleccionados. Apenas 6 isolados (2, 10, 12, 13, 14 e 22) foram negativos para o gene *int1*. 19 isolados revelaram-se positivos (76%), para a presença de integração de classe 1 (Figura 47 e 48). Nestes isolados positivos para o gene *int1* procedeu-se a um novo PCR para amplificação das suas regiões variáveis.

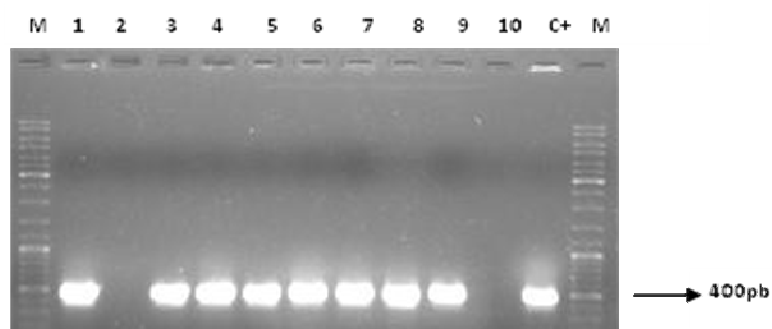


Figura 48: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação do gene da *int1*. **M:** Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; **C+:** Controlo positivo; **1-10:** isolados de *E. coli*.

Estes resultados mostram que os 19 isolados positivos para o gene *int1* possuem como elemento geneticamente móvel o integrão de classe 1.

4.2.2. Pesquisa de zonas variáveis

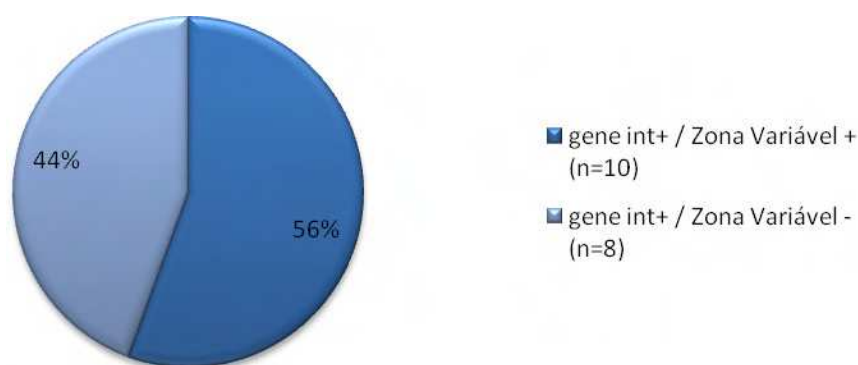


Figura 49: Resultados da pesquisa da zona variável em 19 isolados de *E. coli int1+*.

Dos 19 isolados de *E. coli* positivos para *int1* submetidos a um novo PCR para pesquisa de zonas variáveis, 10 isolados (56%) foram positivos, estando o tamanho da zona variável compreendido entre 800 e 2500 pb (Figura 49 e 50).

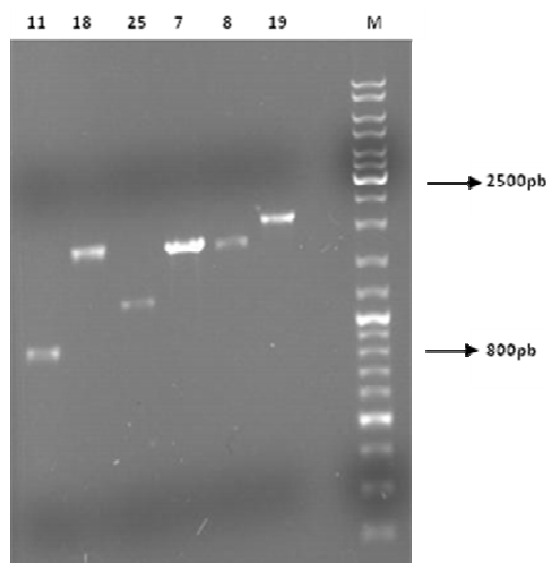


Figura 50: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação da zona variável. **M:** Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; **7, 8, 11, 18, 19 e 25:** isolados de *E. coli*.

Tabela 13: Isolados positivos para a presença de integrões de classe 1, genes cassete amplificados e respectivo tamanho.

Isolado	Cassetes de Genes	Tamanho do “array” (pb)
7	<i>dfrA17 - aadA5</i>	1600
8	<i>dfrA17 - aadA5</i>	1600
11	<i>dfrA5</i>	800
15	<i>dfrA12 - aadA2</i>	1600
16	<i>dfrA12 - aadA2</i>	1600
18	<i>dfrA1 - aadA1</i>	1600
19	<i>dfrA12 - aadA2</i>	2000
20	<i>dfrA12 - aadA2</i>	2000
23	<i>dfrA1 - aadA1</i>	1800
25	<i>aadA1</i>	1100

Os resultados obtidos após sequenciação das zonas variáveis obtidas demonstram uma grande conservação das zonas variáveis amplificadas. Os genes predominantes são variantes *dfr* e *aadA* (Tabela 12). Tendo em conta a base de selecção da população em estudo, a forte presença das variantes *dfr* está de acordo com os resultados esperados para os isolados com zona variável positiva. Estes podem justificar a resistência destas estirpes ao SxT, uma vez que este antibiótico resulta da associação sulfametoxazol+trimetoprim.

4.2.3. Pesquisa de genes *sul1*, *sul2* e *sul3*

Os genes, *sul1* e *sul2*, são responsáveis pela diminuição da afinidade da enzima DHPS para o seu substrato. *sul1* é um gene que se encontra associado com outros genes de resistência localizados em integrões de classe 1, enquanto que o gene *sul2* está habitualmente localizado em pequenos plasmídeos. Na maioria das vezes, estes dois genes são encontrados em igual frequência entre os isolados resistentes às SULs. (SKOLD, 2001).

Recentemente foi descrito, em isolados de *E. coli* de uma população de suínos na Suíça, o gene *sul3* como responsável pela resistência da enzima DHPS à acção das SULs (PERRETEN, 2003).

Vários estudos demonstram a disseminação de *sul3* entre os isolados de *E. coli* de diferentes origens e de diferentes países. A disseminação do gene *sul3* ainda não é bem conhecida, alguns estudos referem que está associada a plasmídeos, outros referem que o gene está flanqueado por transposões em plasmídeos e, mais recentemente, foi descrita a associação do gene *sul3* com outros genes de resistências inseridos em integrões (ANTUNES, 2007).

Antunes, P., et al., refere que em isolados de *Salmonella* o gene *sul3* foi encontrado em integrões de classe 1 e, na maioria desses isolados, este era o único gene responsável pela resistência às SULs (ANTUNES, 2007).

4.2.3.1. Pesquisa do gene *sul1*

Tendo por base a estrutura clássica do integrão, seria de esperar que todos os isolados positivos para o gene *int1* fossem também positivos para a presença do gene *sul1*. Contudo, dos 18 isolados positivos para a integrase apenas 13 se revelaram positivos na pesquisa do gene *sul1* (Tabela 13 e 14).

Perante estes resultados várias hipóteses foram sugeridas e testadas:

(i) o gene *sul1* faz parte do segmento conservado 3'CS (*qacEΔ1/sul1*) e, consequentemente, associado a um integrão de classe 1. Este resultado verificou-se em 6 isolados (8, 15, 16, 19, 20 e 23);

(ii) o gene *sul1* não estava associado ao integrão de classe 1, contudo foi positivo em 4 isolados (1, 3, 9 e 21) com integrase positiva. Estes dados levam a sugerir que o *sul1* nestes isolados não faz parte do segmento conservado 3'CS;

(iii) nos isolados 10, 13 e 22, negativos para integrase, foi detectada a presença do gene *sul1*. Neste caso também não é possível estabelecer qualquer tipo de relação entre as duas estruturas.

Independentemente das associações estabelecidas a presença do gene *sul1* nos diferentes isolados pode justificar a resistência ao SxT.

4.2.3.2. Pesquisa do gene *sul2*

Outro gene responsável pela resistência às SULs é o gene *sul2*. Na população em estudo verificou-se que este estava presente em 16 isolados. Destes, 10 foram simultaneamente positivos para a presença do gene *sul1* e *sul2* (Tabela 13 e 14).

No que diz respeito ao gene *sul2* este não é descrito na literatura como estando associado a integrões. É frequentemente descrito como estando associado a outros elementos móveis, como por exemplo plasmídeos (ANTUNES, 2007).

4.2.3.3. Pesquisa do gene *sul3*

Estudos recentes reportam uma modificação da estrutura tida como clássica de um integrão de classe 1. Esta alteração consiste na substituição do segmento conservado 3'CS pelo gene *sul3* (ANTUNES, 2007, GRAPE, 2003, TOLEMAN, 2007). Assim sendo e, como base nestes estudos, os isolados positivos para *int1* e com zona variável não determinada (ND) foram submetidos a PCR para pesquisa do gene *sul3*. Dos resultados obtidos verificou-se que apenas 2 foram positivos (isolado 6 e 21) para a presença deste gene (Figura 51 e Tabela 13).

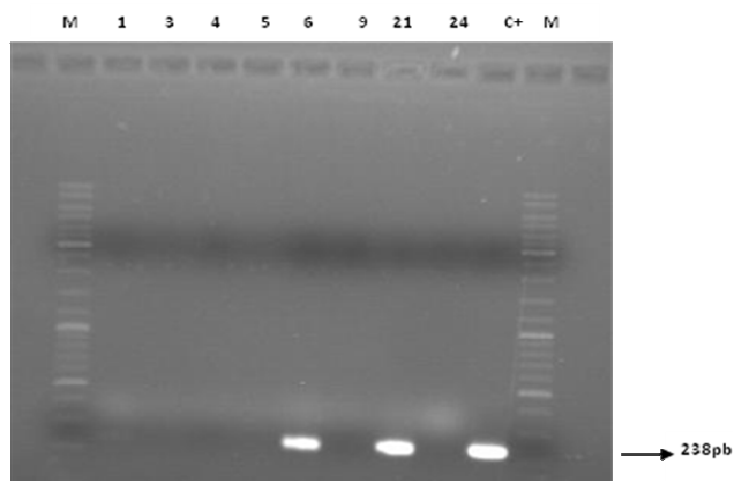


Figura 51: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação do gene *sul3*. **M:** Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; **C+:** Controlo positivo; **6 e 21:** isolados de *E. coli*.

Os dois isolados positivos para *sul3* foram submetidos a novo PCR utilizando um iniciador a ancorar no gene *int1* e outro no gene *sul3*, com o objectivo de verificar se nestes casos o gene *sul3* estaria a substituir o segmento conservado 3'CS, tal como descrito por outros autores (GRAPE, 2003, TOLEMAN, 2007).

Deste PCR e para o isolado 6 resultou um produto com cerca de 3200pb (Figura 52), que se encontra em fase de caracterização molecular de forma a justificar a substituição do segmento conservado 3'CS pelo gene *sul3*, como é o esperado.

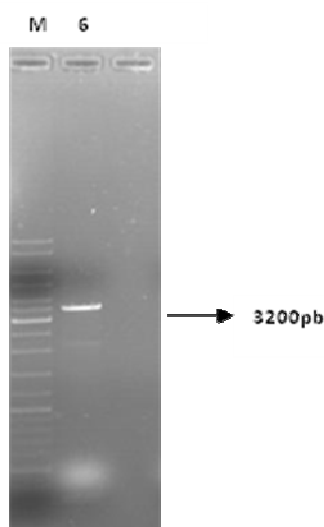


Figura 52: Electroforese do produto resultante da amplificação utilizando o primer a ancorar no gene *Int1* e outro no gene *sul3*. **M:** Marcador de peso molecular gene ruler 100pb; **6:** isolado de *E. coli*.

Os resultados obtidos para a pesquisa de *sul3* comparativamente estudos realizados anteriormente foram surpreendentes.

Um estudo realizado com 75 estirpes de *E. coli* recolhidas de pacientes do Hospital Karolinska, em 2003, mostrou que 3% das estirpes foram positivas para a pesquisa do gene *sul3* (GRAPE, 2003). No presente estudo, os resultados foram sem dúvida mais elevados do que o esperado. Em 25 estirpes de *E. coli* oriundas da comunidade 8% foram positivas para a pesquisa do gene *sul3*. Estes resultados são preocupantes uma vez que se tratam de estirpes oriundas da comunidade, que desta forma estão cada vez mais resistentes aos antibióticos administrados.

Tabela 14: Presença dos genes *sul* em 25 isolados de *E. coli*.

Isolados	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul1</i> e <i>sul2</i>	<i>sul3</i>
<i>E. coli</i> (n=25)	13 (52%)	16 (64%)	10 (40%)	2 (8%)

4.2.4. Isolados de *E. coli* negativos para a presença de sequências específicas dos genes *dfr*, *sul1*, *sul2* e *sul3*

Nos isolados 2 e 25 negativos para a pesquisa por PCR de sequências de DNA dos genes *dfr*, *sul1*, *sul2* e *sul3* a resistência ao SxT pode ser devida a outros mecanismos de resistência não desenvolvidos neste trabalho (Tabela 14).

A resistência às SULs para além de ser conferida pela aquisição de um gene alternativo (*sul*), cujo resultado é a diminuição da afinidade da enzima DHPS para o seu substrato, pode também, ser resultante de mutações no gene cromossomal DHPS (*folP*) (SKOLD, 2001).

A resistência deste isolado ao SxT pode ainda ser devida a mecanismos de resistência relacionados com o TMP e não abordados neste trabalho, como por exemplo a impermeabilidade celular, vias metabólicas alternativas, produção de enzimas DHFR com alterações cromossomais que as tornam resistentes, super-produção dessas enzimas e existência de plasmídeos que transportam genes de resistência, os *DHFRs* (HUOVINEN, 1987).

A resistência ao TMP mediada por plasmídeos é representada por vários genes, designados de *DHFRs*. São conhecidos quase 20 genes responsáveis pela expressão da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), estes estão sequencialmente numerados partindo do *dfr1*, o primeiro gene identificado. A transferência destes genes entre as bactérias é horizontal, sendo a sua origem exacta desconhecida. A sua elevada prevalência entre as bactérias pode ser explicada pelo facto de estarem localizados em integrões. O gene de resistência ao TMP mais prevalente entre as bactérias de Gram negativo parece ser o *dfr1*, que se localiza em integrões de classe 1 e 2. O transposão Tn7, surge muito frequentemente nos isolados resistentes dada a sua elevada inserção no cromossoma de *E. coli* e de outras espécies bacterianas. Considerando os isolados bacterianos estudados até ao momento, o Tn7 localiza-se mais frequentemente no cromossoma e menos em plasmídeos (HUOVINEN, 1987, SKOLD, 2001).

Outra forma de resistência ao TMP é a resistência cromossomal devida a mutações no gene *dfr* que conduzem à produção exagerada de DHFR e, conseqüentemente, à

diminuição da afinidade do ácido dihidrofólico ao TMP. Este aumento de produção pode ser explicado por quatro formas: (i) mutações na zona do promotor; (ii) mutação por inserção de 1pb na região entre a região promotora (“region-10”) e o codão de iniciação; (iii) mutações severas que otimizam o local de ligação do ribossoma e (iv) mutações severas no gene estrutural que conduzem à utilização mais frequente de alguns codões (HUOVINEN, 1987, HUOVINEN, 1995, SKOLD, 2001).

Tabela 15: Resumo dos dados obtidos.

Isolados	<i>int1</i>	ZV	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>
1	+	ND	+	+	-
2	-	-	-	-	-
3	+	ND	+	-	-
4	+	ND	-	-	-
5	+	ND	-	+	-
6	+	ND	-	-	+
7	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	-
9	+	ND	+	+	-
10	-	-	+	+	-
11	+	+	-	-	-
12	-	-	-	+	-
13	-	-	+	+	-
14	-	-	-	+	-
15	+	+	+	+	-
16	+	+	+	-	-
17	+	ND	-	-	-
18	+	+	-	+	-
19	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	-
21	+	ND	+	-	+
22	-	-	+	+	-
23	+	+	+	+	-
24	+	ND	-	+	-
25	+	+	-	-	-

ND: Não determinado

4.2.5. Estudo da variabilidade genética

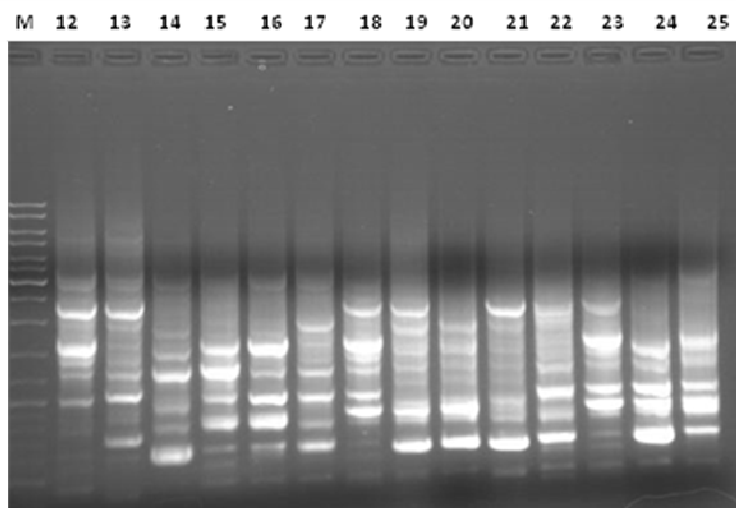


Figura 53: Electroforese dos produtos resultantes de ERIC-PCR. **M:** Marcador de peso molecular gene ruler 100pb.

Sendo os isolados em estudo provenientes da comunidade foi ainda objectivo deste estudo avaliar a sua variabilidade genética. Esta pesquisa foi realizada recorrendo à técnica de ERIC-PCR. Uma análise dos produtos de amplificação obtidos permitiu identificar 4 pares de clones (3/4; 8/10; 15/16; 18/23).

Tendo em conta os resultados obtidos num estudo realizado por *Paradela A. (2008)* (PARADELA, 2008) com 88 estirpes de *E. coli*, oriundas do meio hospitalar onde se conseguiu identificar 6 clones, os resultados obtidos no presente estudo foram mais elevados, o que era de esperar tendo em conta que se trata de estirpes de ambulatório.

Relativamente aos pares de clones encontrados não foi possível inferir relativamente a dados demográficos. Tendo em conta os genes pesquisados neste estudo verificou-se que o par **3/4** não apresenta as mesmas características. São ambos positivos para a presença do gene *int1*, assim como zona variável não determinada, no entanto o isolado 3 é positivo para a presença do gene *sull*, o que não se verifica no isolado 4 (Tabela 14).

No par **8/10** verificam-se diferenças entre ambos, o isolado 8 é positivo para a presença de *int1*, gene *sul1*, *sul2* e zona variável, enquanto o isolado 10 foi negativo para a presença de *int1* e positivo para os restantes.

No par **15/16** verificam-se diferenças entre ambos, o isolado 15 é positivo para a presença de *int1*, gene *sul1*, *sul2* e zona variável, enquanto o isolado 16 foi negativo para a presença de *sul2* e positivo para os restantes.

No par **18/23** verificam-se diferenças entre ambos, o isolado 23 é positivo para a presença de *int1*, gene *sul1*, *sul2* e zona variável, enquanto o isolado 18 foi negativo para a presença de *sul1* e positivo para os restantes.

Estas diferenças podem ser devido ao facto da técnica utilizada para o estudo da variabilidade genética comparar os isolados a nível cromossomal. Assim, as diferenças verificadas a nível dos genes pesquisados podem ficar a dever-se à presença de DNA extra-cromossomal, nomeadamente plasmídeos que transportam estes genes.

V. Conclusões

Do presente estudo foi possível retirar as seguintes conclusões:

1. *E. coli* é o principal microrganismo responsável pela maioria das infecções urinárias. Estas infecções apresentam uma elevada taxa de incidência a nível da comunidade e são mais frequentes em doentes do sexo feminino com uma média de idades compreendidas entre 55 e 58 anos.
2. Os isolados de *E. coli* apresentaram mais resistências à amoxicilina, cefatrizina, norfloxacin e sulfametoxazol+trimetoprim. Estes resultados sugerem o aumento das resistências a determinados antibióticos em estirpes responsáveis pela maioria das infecções existentes na comunidade. É, sem dúvida, um resultado preocupante porque o tratamento começa a ser cada vez mais difícil de implementar. Estes resultados ilustram terapias empíricas impróprias, tratamento eficaz mais tardio, mais tóxico e mais dispendioso;
3. A percentagem de resistência ao SxT em estirpes de *E.coli* não é a mais elevada mas a associação de genes de resistência em elementos genéticos móveis pode indicar uma forte disseminação da resistência e um aumento no fracasso dos tratamentos com este grupo de antibióticos;
4. Verificou-se uma forte incidência dos genes *sul* nos 25 isolados em estudo resistentes ao SxT, o que compromete o uso deste antibiótico. De salientar que a população em estudo é proveniente de ambulatório, onde o nível de resistência esperado deveria ser mais baixo. Por outro lado, foram detectadas variantes do gene *dfr*, reforçando a resistência destes isolados à combinação SxT;
5. Os resultados demonstram a forte disseminação de genes de resistência a SULs e TMP na comunidade do distrito de Aveiro, o que poderá comprometer o uso destes antibióticos num futuro próximo.

VI. Bibliografia

ALANIS, A. J. - Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Archives of Medical Research - Elsevier (2005), p. 697–705.

ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. - Molecular Biology of the Cell, Fourth edition Garland Science, 2001.

ANTUNES, P. M., J.; PEIXE, L. - Dissemination of sul3-Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an Unusual 3' Conserved Sequence Region among Salmonella Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 51, n.º 4 (2007), p. 1545-1548.

APPELBAUM, P. C. H., P. A. - The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. International Journal of Antimicrobial Agents 16. (2000), p. 5-15.

BARLOW, R. S. P., J. M.; DESMARCHELIER, P. M.; GOBIUS, K. S. - Isolation and Characterization of Integron-Containing Bacteria without Antibiotic Selection. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 48, n.º 3 (2004), p. 838-842.

BENNETT, P. M. - Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. British Journal of Pharmacology. ISSN 1476-5381. Vol. 153, n.º S1 (2008), p. S347-S357.

BIOMÉRIEUX - Manual de meios de cultura e suplementos. 2003.

BLATT, J. M., M. - Perfil de microrganismos causadores de infecções do tracto urinário em pacientes internados. . Rev. Panam. Infectol.. Vol. 7 (2005), p. 10-14

BOERLIN, P. R.-S., R. J. - Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. Vol. 9(2) (2008), p. 115-126.

BUTLER, C. C. D., F.; HEGINBOTHOM, M.; MASON, B.; ROBERTS, Z.; HILLIER, S.; HOWE, R.; PALMER, S.; HOWARD, A. - Containing antibiotic resistance: decreased antibiotic-resistant coliform urinary tract infections with reduction in antibiotic prescribing by general practices. British Journal of General Practice. (2007), p. 785-791.

CORREIA, C. C., E.; PERES, A., *ET AL.*; - Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos Antimicrobianos. . Acta Med. Port.. Vol. 20 (2007), p. 543-549.

DEPARDIEU, F. P., I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. - Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. Clinical microbiology reviews. Vol. 20(1) (2007), p. 79-114.

FLORENCE DEPARDIEU, I. P., ROLAND LECLERCQ, EKKEHARD COLLATZ AND PATRICE COURVALIN - Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. Vol. 20(1) (2007), p. 79-114.

FLUIT, A. C. S., F. J. - Resistance integrons and super-integrons. Clinical Microbiology & Infection. ISSN 1469-0691. Vol. 10, n.º 4 (2004), p. 272-288.

FLUIT, A. C. V., M. R.; SCHMITZ, F. - Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clinical Microbiology reviews. Vol. 14(4) (2001), p. 836-871.

FOXMAN, B. Z., L.; KOOPMAN, J.; MANNING, S.; MARRS, C. - Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. Epidemiologic Perspectives & Innovations. ISSN 1742-5573. Vol. 2, n.º 1 (2005), p. 10.

GRAPE, M. S., L.; KRONVALL, G. - Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Vol. 52 (2003), p. 1022-1024.

HARBOTTLE, H. T., S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G. - Genetics of antimicrobial resistance. Animal Biotechnology. Vol. 17 (2006), p. 111-114.

HOA, P. T. P. N., L.; VIET, P. H.; SUZUKI, S. - Detection of the sul1, sul2, and sul3 genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. Science of the total environment. Vol. 405 (2008), p. 377-384.

HOOPER, J. S. W. A. D. C. - Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. Clinical microbiology reviews. Vol. 2 (4) (1989), p. 378-424.

HUOVINEN, P. - Trimethoprim Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 31 (1987), p. 1451-1456.

HUOVINEN, P. L. S., M.; SWEDBERG, G.; SKOLD, O. - Trimethoprim and Sulfonamide Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. Vol. 39, No. 2 (1995), p. 279-289.

INDIRA U. M.; SCOTT, J. H. - Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. PNAS Vol. 103 (2006), p. 14170-14175.

INFARMED - [em linha]. [Consult. Disponível em WWW:<URL:http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>.

JAMES A. KARLOWSKY, L. J. K., CLYDE THORNSBERRY, MARK E. JONES, AND DANIEL F. SAHM - Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female Outpatients in the United States. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 46 (2002), p. 2540-2545.

JAMES A.; KARLOWSKY, L. C., T.; MARK, E. J.; SAHM, D. - Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female

Outpatients in the United States. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 46 (2002), p. 2540-2545.

KALPANA, G. T., M. H.; WALTER, E. S. - Increasing Antimicrobial Resistance and the Management of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infections Annals of Internal Medicine. Vol. 135 (2001), p. 41-50

KONEMAN, E. W. A., S. D.; JANDA, M. W. *ET AL.* - Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Fifth Edition Lippincott - Raven Publishers 1997.

KOTRA, L. P. H., J.; MOBASHERY, S. - Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 44, n.º 12 (2000), p. 3249-3256.

LECLERCQ, M. G., M.; TULKENS, Y.; M, PAUL. - Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 43, n.º 4 (1999), p. 727-737.

LI, X.-Z. - Quinolone Resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. International Journal of Antimicrobial Agents Vol. 25 (2005), p. 453-463.

LOUREIRO, L. M., C.; FERNÁNDEZ, M.; - Infecciones del tracto urinario. Pautas de tratamiento empírico de la infección no complicada según los datos de sensibilidad antimicrobiana de un área de salud. . FAP - Farmacia de Atención Primaria. Vol. 4 (2006), p. 20-23.

MANGES, A. R. T., H.; TELLIS, P.; VINCENT, C.; TELLIER, P. - Endemic and Epidemic Lineages of *Escherichia coli* that Cause Urinary Tract Infections. Emerging Infectious Diseases. Vol. 14 (10) (2008), p. 1575-1583.

MANNING, S. D. - Escherichia coli infections - Deadly Diseases and Epidemics. Chelsea house publishers, 2005.

MARCIA, A. K., MD. - Trimethoprim- Sulfamethoxazole: Pharmacokinetics, Clinical Uses, and Adverse Reactions. Texas Health Institute Journal. Vol. 17 (2) (1990), p. 86-93.

MARTINEZ, J. L. B., F. - Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. Clin. Microbiol. Rev. Vol. 15, n.º 4 (2002), p. 647-679.

MASTERS, P. A. O. B., T. A.; ZURLO, J.; MILLER, D. Q.; JOSHI, N. - Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. Arch Intern Med. Vol. 163 (2003), p. 402-410.

MELLA, S. M. A., G. L.; MUNOZ, M. Q. *ET AL* - Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. Rev Chil Infect Vol. 17 (1) (2000), p. 53-66.

MICHELIM, A. M., G.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. - Comparison of PCR-Based Molecular Markers for the

Characterization of *Proteus mirabilis* Clinical Isolates. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. Vol. 12(5) (2008), p. 423-429.

MIMS, C. D., H. M.; ROITT, I. ET AL. - Medical Microbiology, Trird Edition 2004.

NOJA, P. K. N., S. T.; BERGMAN, M.; VOIPIO,T.; PAAKKARI, P.; HUOVINEN, P.; SARKKINEN, H. - Connection between Trimethoprim-Sulfamethoxazole Use and Resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 52(7) (2008), p. 2480-2485.

PARADELA, A. M. - Disseminação de genes de resistência em estirpes clinicas de E. coli. 2008.

PERRETEEN, V. B., P. - A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 47 (3) (2003), p. 1169–1172.

PHILIP A. MASTERS, M. T. A. O. B., MD; JOHN ZURLO, MD; DEBRA Q. MILLER, MD; NIRMAL JOSHI, MD - Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. Arch Intern Med. Vol. 163 (2003), p. 402-410.

PIATTI, G. M., A.; BALISTRERI, M.; SCHITO, A. - Virulence Factors in Urinary *Escherichia coli* Strains: Phylogenetic Background and Quinolone and Fluoroquinolone Resistance. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 46(2) (2008), p. 480-487.

PITOUT, J. D. D. N., P.; LAUPLAND, K. B.; POIREL, L. - Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum {beta}-lactamases (ESBLs) in the community. J. Antimicrob. Chemother. Vol. 56, n.º 1 (2005), p. 52-59.

REYNOLDS, R. P., N.; COLMAN, M.; WILLIAMS, A.; LIVERMORE, D.; MACGOWAN, A. - Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001–2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 53 (2004), p. 1018–1032.

RONALD, A. - The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. . Dis Mon Vol. 49(2) (2003), p. 71-82.

SINGH, A. G., R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. - Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. Clin. Microbiol. Rev. Vol. 19, n.º 3 (2006), p. 512-530.

SIPAHI, O. R. - Economics of antibiotic resistance. Expert Review of Anti-infective Therapy. Vol. 6, n.º 4 (2008), p. 523-539.

SKOLD, O. - Resistance to trimethoprim and sulfonamides. Vet. Res. Vol. 32 (2001), p. 261–273.

SMET, A. M. P., A.; DEWULF, D.; HEYNDRICKX, J.; CATRY, M.; HERMAN, B.; HAESEBROUCK, L.; FREDY, B. P. - Diversity of Extended-Spectrum {beta}-Lactamases and Class C {beta}-Lactamases among Cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian Broiler Farms. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 52, n.º 4 (2008), p. 1238-1243.

SNARY, E. L. K., L. A.; DAVISON, H. C.; TEALE, C. J.; WOOLDRIDGE, M. - Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. J. Antimicrob. Chemother. Vol. 53, n.º 6 (2004), p. 906-917.

SOTO, S. M. J. D. A., M. T.; VILA, J. - Quinolones Induce Partial or Total Loss of Pathogenicity Islands in Uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-Dependent or -Independent Pathways, Respectively. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 50 (2006), p. 649-653.

SUÁREZ, C. G., F. - Antibióticos betalactámicos Enferm Infecc Microbiol Clin Vol. 27(2) (2009), p. 116-29.

SUMMERS, A. O. - Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-Resistance Problem. Animal Biotechnology. ISSN 1049-5398. Vol. 17, n.º 2 (2006), p. 125 - 135.

TOLEMAN, M. A. B., P. M.; TIMOTHY, R. W. - Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 58 (2006a), p. 1-6.

TOLEMAN, M. A. B., P. M.; WALSH, T. R. - ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 70, n.º 2 (2006b), p. 296-316.

TOLEMAN, M. A. V., H.; SEKAR, U.; KAMAT, V.; WALSH, T. R. - blaVIM-2-Harboring Integrons Isolated in India, Russia, and the United States Arise from an Ancestral Class 1 Integron Predating the Formation of the 3' Conserved Sequence. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 51 (2007), p. 2636-2638.

TURNER, S. M. C., R. R.; JIANG, Z.-D.; DUPONT, H.; GYLES, C.; PENN, C. W.; PALLEN, M. J.; HENDERSON, I. R. - Phylogenetic Comparisons Reveal Multiple Acquisitions of the Toxin Genes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Different Evolutionary Lineages. J. Clin. Microbiol. Vol. 44, n.º 12 (2006), p. 4528-4536.

VERSALOVIC, J. K., T.; LUPSKI, R. - Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl. Acids Res. Vol. 19, n.º 24 (1991), p. 6823-6831.

WAGNER, A. - Cooperation is Fleeting in the World of Transposable Elements. PLoS Comput Biol. Vol. 2, n.º 12 (2006), p. 162.

WOLLFSON, J. S. H., D. C. - The Fluoroquinolones: Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity In Vitro. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 28(4) (1985), p. 581-586.

YAMAMOTO, S. - Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. Journal of Infection and Chemotherapy. Vol. 13, n.º 2 (2007), p. 68-73.

ZWAR, N. W., J.; GORDON, J.; SANSON-FISHER, R.; KEHOE, L. - Influencing antibiotic prescribing in general practice: a trial of prescriber feedback and management guidelines. Fam. Pract. Vol. 16, n.º 5 (1999), p. 495-500.